8600-1
9
2-1

NAUNYN-SCHMIEDEBERGS

ARCHIV

FÜR

EXPERIMENTELLE PATHOLOGIE UND PHARMAKOLOGIE

UNTER MITWIRKUNG
DER DEUTSCHEN PHARMAKOLOGISCHEN GESELLSCHAFT

HERAUSGEGEBEN VON

DR. L. HEILMEYER
PROFESSOR DER INNEREN MEDIZIN
FREIBURG i. Br.

DR. H. HERKEN
PROFESSOR DER PHARMAKOLOGIE
BERLIN

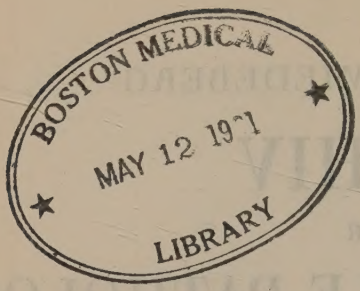
DR. P. HOLTZ
PROFESSOR DER PHARMAKOLOGIE
FRANKFURT

DR. L. LENDLE
PROFESSOR DER PHARMAKOLOGIE
GÖTTINGEN

233. BAND

MIT 155 TEXTABBILDUNGEN

SPRINGER-VERLAG
BERLIN · GÖTTINGEN · HEIDELBERG
1958



Alle Rechte vorbehalten
Ohne ausdrückliche Genehmigung des Verlages
ist es auch nicht gestattet, einzelne Beiträge oder Teile daraus
auf photomechanischem Wege (Photokopie, Mikrokopie) zu vervielfältigen
Springer-Verlag, Berlin · Göttingen · Heidelberg
Printed in Germany

Druck: Wiesbadener Graphische Betriebe GmbH

Die Wiedergabe von Gebrauchsnamen, Handelsnamen, Warenbezeichnungen usw. in dieser Zeitschrift berechtigt auch ohne besondere Kennzeichnung nicht zu der Annahme, daß solche Namen im Sinn der Warenzeichen- und Markenschutz-Gesetzgebung als frei zu betrachten wären und daher von jedermann benutzt werden dürften

Inhaltsverzeichnis

Seite

Arnold, M., s. Timm, F.

Balzer, H., s. Holtz, P., und E. Westermann

Bartels, M., H. Grzemba, E. Schmid und R. Taugner, Unveränderter O_2-Verbrauch der Skeletmuskulatur nach ATP, Strophanthin und Oxyäthyltheophyllin 495

Bayer, H.-H., s. Henschler, D.

Braun, T., Z. Chaloupka und J. Neuwirt, Der Einfluß des Chlorpromazins auf den Stoffwechsel von Stickstoff und Eiweiß. Mit 2 Textabbildungen . . 226

Brunner, H., G. Kuschinsky und G. Peters, Die Wasserdiurese und ihre Begrenzung nach ein- oder mehrmaliger oraler Gabe von Wasser bei der Ratte. Mit 2 Textabbildungen 1

—, —, —, Die Verteilung von Wasser, Natrium und Kalium im Organismus der Ratte nach einer großen oralen Wassergabe. Mit 4 Textabbildungen . . 19

—, —, —, Ausscheidung und Verteilung von Wasser und Mineralien nach oralen Gaben von physiologischer NaCl-Lösung bei der Ratte. Mit 4 Textabbildungen 39

—, —, —, und H. Vorherr, Veränderungen der Form der Tubuli und des Wassergehalts der Nieren bei der Mannit- und Sulfatdiurese der Ratte. Mit 2 Textabbildungen 57

Chaloupka, Z., s. Braun, T., und J. Neuwirt

Coper, H., H. Herken und G. Senft, Der Gehalt des Herzmuskels an Adenosintriphosphorsäure bei experimentellen Ödemen. Mit 3 Textabbildungen . 192

Czollner, F., s. Kelentey, B., und E. Stenszky

Engler, R., P. Holtz und H. W. Raudonat, Über die Spaltung herzwirksamer Glykoside im Tierkörper. Mit 3 Textabbildungen 393

Faller, J., s. Szekeres, L., und Gy. Lichner

Femmer, K., Über die Giftwirkung von Monomethyl- und Dimethylthioacetamid 376

Friedburg, H., E. U. Schäfer und R. Taugner, Verbesserungen am bubble-flow-meter mit automatischer Registrierung. Mit 1 Textabbildung. . . 567

Gillissen, J., H. Hochrein, H. Meissdörfer und R. Taugner, Die renale Sulfatausscheidung bei Katzen und Hunden nach Versuchen mit anorganischem Sulfat und Phenylsulfat. Mit 3 Textabbildungen 541

Goslar, H. G., Über die Wirkung eines standardisierten Thymusextraktes auf die Häutungsvorgänge und auf einige Organe von Natrix natrix L. Mit 7 Textabbildungen 201

Greeff, K., Vergleich der kaliuretischen Wirkung verschiedener Glykoside des Strophanthidins und Digitoxigenins bei parenteraler und enteraler Applikation. Mit 4 Textabbildungen 468

Grobecker, H., s. Schümann, H. J.

Gross, F., und H. Schmidt, Natrium- und Kaliumgehalt von Plasma und Geweben beim Cortexon-Hochdruck. Mit 1 Textabbildung 311

—, und P. Lichtlen, Verstärkung der pressorischen Wirkung von Renin, drucksteigernden Peptiden und adrenergischen Wirkstoffen nach Nephrektomie und bei Überdosierung von Cortexon und Kochsalz an der Ratte. Mit 6 Textabbildungen 323

Seite

Grzemba, H., s. Bartels, M., E. Schmid und R. Taugner

Helge, H., Stoffwechselstörungen bei Neurospora crassa nach Einwirkung der wachstumshemmenden Hexachlorcyclohexane. Mit 3 Textabbildungen . . 409

Henschler, D., und H.-H. Bayer, Toxikologische Untersuchungen über Triphenylphosphat, Trixylenylphosphate und Triarylphosphate aus Mischungen homologer Phenole 512

Herken, H., D. Maibauer und D. Neubert, Der Einfluß von Äthionin und anderen Lebergiften auf Fermentsysteme der Lebermikrosomen. Mit 5 Textabbildungen 139

—, —, —, Berichtigung zu vorstehender Arbeit 494

—, —, und F. Weygand, Stoffwechsel und Ausscheidung von *m*-Inosit. Mit 2 Textabbildungen 301

—, s. Coper, H., und G. Senft

Hochrein, H., s. Gillissen, J., H. Meissdörfer und R. Taugner

Holler, B., s. Raudonat, H. W.

Holtz, P., H. Balzer und E. Westermann, Beeinflussung der Narkosedauer durch Hemmung der Cholinesterase des Gehirns. Mit 6 Textabbildungen . 438

—, s. Engler, R., und H. W. Raudonat

Job, C., und W. Schaumann, Eine Methode zur gleichzeitigen Erfassung pharmakologischer Wirkungen auf das Atemzentrum und die neuromuskuläre Übertragung. Mit 4 Textabbildungen 255

Kelentey, B., E. Stenszky und F. Czollner, Neue Untersuchungen zur Pharmakologie des Narceins. Mit 3 Textabbildungen 550

Kiese, M., und K.-H. Plattig, Kreisprozeß der Hämiglobinbildung durch Benzylphenylhydroxylamin Benzalphenylnitron. Mit 7 Textabbildungen . 484

Kobinger, W., Beeinflussung der Cardiazolkrampfschwelle durch veränderten 5-Hydroxytryptamingehalt des Zentralnervensystems. Mit 1 Textabbildung 559

Kramer, M., Zur antiphlogistischen Wirkung des Histaminliberators Compound 48/80, einiger Antihistaminica und einiger Antirheumatica 125

Kroneberg, G., Pharmakologie des Rauwolfia-Alkaloids Raubasin (δ-Yohimbin-Ajmalicin). Mit 8 Textabbildungen 72

Krüskemper, H.-L., Über den Einfluß von Cortison und Schilddrüsenhormonen auf die Serumproteine. Mit 2 Textabbildungen 284

Kuschinsky, G., s. Brunner, H., und G. Peters (S. 1, 19, 39)

—, —, —, und H. Vorherr

—, und E. Muscholl, Die Wirkung von Lösungsvermittlern des Theophyllin auf die Kontraktionskraft des Katzenpapillarmuskels 250

Lichner, Gy., s. Szekeres, L., und J. Faller

Lichtlen, P., s. Gross, F.

Maibauer, D., s. Herken, H., und D. Neubert

—, —, und F. Weygand

—, s. Neubert, D.

Meissdörfer, H., s. Gillissen, J., H. Hochrein und R. Taugner

Muscholl, E., s. Kuschinsky, G.

Neubert, D., und J. Schaefer, Wirkungsverlust des Diäthyl-p-Nitrophenylphosphats und Oktamethylpyrophosphoramids nach Vorbehandlung mit α-Hexachlorcyclohexan. Mit 7 Textabbildungen 151

Seite

Neubert, D., und D. Maibauer, Untersuchungen über den Antagonismus zwischen Atropin und Cholinesterasegiften mit Hilfe einer mikrobiologischen Methodik. Mit 2 Textabbildungen 163

—, s. Herken, H., und D. Maibauer

Neuwirt, J., s. Braun, T., und Z. Chaloupka

Opitz, K., Über die Bildung von Glucose und Glykogen aus 1,2-Propandiol in vitro 355

Peters, G., s. Brunner, H., und G. Kuschinsky (S. 1, 19, 39)

—, —, —, und H. Vorherr

Plattig, K.-H., s. Kiese, M.

Raudonat, H. W., und B. Holler, Über die herzwirksame Komponente des Kobragiftes („Cardiotoxin"). Mit 3 Textabbildungen 431

—, s. Engler, R., und P. Holtz

Reber, K., und A. Studer, Experimentelle Beiträge zur Pathophysiologie des Klärfaktors. Mit 3 Textabbildungen 384

Remmer, H., Geschlechtsspezifische Unterschiede in der Entgiftung von Evipan und Thiopental bei Ratten. Mit 4 Textabbildungen 173

—, Die Verstärkung der Abbaugeschwindigkeit von Evipan durch Glykocorticoide. Mit 6 Textabbildungen 184

Repke, K., Die chemische Bestimmung von Digitoxin in Geweben und Ausscheidungen. Mit 2 Textabbildungen 261

—, Verteilung, Ausscheidung und Stoffwechsel von Digitoxin bei der Ratte . 271

Ri, H. dal, und H. Slama, Ein einfaches Gerät zur Umwandlung kleinster mechanischer Impulse in elektrische Steuerimpulse. Mit 2 Textabbildungen 556

Schaefer, J., s. Neubert, D.

Schäfer, E. U., s. Friedburg H., und R. Taugner

Schaper, J., und G. Senft, Bestimmung des extracellulären Raumes von Ratten mit Hilfe von Insulin. Mit 1 Textabbildung 134

Schaumann, W., Antagonistische Wirkung von Morphin und Cholinesterase-Hemmern auf das Atemzentrum. Mit 6 Textabbildungen 98

—, Zusammenhänge zwischen der Wirkung der Analgetica und Sympathicomimetica auf den Meerschweinchen-Dünndarm. Mit 6 Textabbildungen . 112

—, s. Job, C.

Schlosser, L., Ein Federmanometer zur Registrierung des Blutdrucks und der Pulsfrequenz im pharmakologischen Experiment. Mit 5 Textabbildungen . 506

Schmid, E., s. Bartels, M., H. Grzemba und R. Taugner

Schmidt, H., s. Gross, F.

Schmidt, R. F., Über die Acetylcholin-Empfindlichkeit verschiedener Herzabschnitte. Mit 4 Testabbildungen 531

Schoetensack, W., Über Pyrazolidine und ihre pharmakologische Differenzierung 365

Schümann, H. J., Die Wirkung von Insulin und Reserpin auf den Adrenalin- und ATP-Gehalt der chromaffinen Granula des Nebennierenmarks. Mit 1 Textabbildung 237

—, unter Mitarbeit von H. Grobecker, Über den Noradrenalin- und ATP-Gehalt sympathischer Nerven 296

Seite

Senft, G., s. Schaper, J.
Senft, G., s. Coper, H., und H. Herken
Slama, H., s. Ri, H. dal
Stenszky, E., s. Kelentey, B., und F. Czollner
Studer, A., s. Reber, K.
Szekeres, L., Wirkung von Pharmaka auf die Erregungsleitung am hypoxischen Herzen 338
—, Einfluß von Arzneimitteln auf die Kontraktilität des Herzmuskels in Hypoxie. Mit 1 Textabbildung 348
—, J. Faller und Gy. Lichner, Empfindlichkeit der einzelnen Reizbildungszentren des Herzens gegenüber Kohlensäure und Hypoxie. Mit 3 Textabbildungen 343
Taugner, R., s. Bartels, M., H. Grzemba und E. Schmid
Taugner, R., s. Friedburg, H. und E. U. Schäfer
—, s. Gillissen, J., H. Hochrein und H. Meissdörfer
Timm, F., und M. Arnold, Histochemische Studien zur Ausscheidung des Bleisalzes der Äthylendiamintetraessigsäure durch die Rattenniere. Mit 5 Textabbildungen 422
Vlk, J., Zur Frage des herzmuskeleigenen Acetylcholins 233
Vogel, G., Zur quantitativen photometrischen Bestimmung der freien Adeninnucleotide im menschlichen Blut. Mit 2 Textabbildungen 499
Vorherr, H., s. Brunner, H., G. Kuschinsky und G. Peters
Westermann, E., Über die Wirkung von 5-Hydroxytryptamin (Serotonin) auf die Atmung. Mit 9 Textabbildungen 518
—, s. Holtz, P., und H. Balzer
Weygand, F., s. Herken, H., und D. Maibauer

Arch. exper. Path. u. Pharmakol., Bd. 233, S. 1—18 (1958)

Aus dem Pharmakologischen Institut der Universität Mainz
(Direktor: Prof. Dr. G. Kuschinsky)

Die Wasserdiurese und ihre Begrenzung nach ein- oder mehrmaliger oraler Gabe von Wasser bei der Ratte

Von
H. Brunner, G. Kuschinsky und G. Peters*

Mit 2 Textabbildungen

(Eingegangen am 29. Juli 1957)

Zur Einleitung einer Wasserdiurese durch ein- oder mehrmalige Wassergaben mit der Magensonde bei der Ratte werden von verschiedenen Untersuchern sehr verschiedene Mengen von Wasser oder stark hypotonischen Kochsalzlösungen gegeben (Burn 1931; Anselmino, Hoffmann u. Kennedy 1932; Gilman u. Goodman 1937; Robinson u. Farr 1940; Jeffers, Livezey u. Austin 1942; Langecker u. Kuschinsky 1947; Ralli, Raisz, Leslie, Dumm u. Laken 1950; Ham u. Landis 1942; Birnie, Jenkins, Eversole u. Gaunt 1949; Szentgyörgyi u. Békés 1951; Baïsset, Huron u. Lareng 1954; Stein, Jinks u. Mirsky 1952; Crawford u. Pinkham 1954; Holeček, Polák u. Jirásek 1954; Valeri u. Perrini 1953; Ginsburg 1951; Ginsburg u. Heller 1953; Lewis 1953). Da Pharmaka (Brunner, Kuschinsky u. Peters 1956a) die maximal erreichbare Wasserdiurese unter Umständen anders beeinflussen als die nur angedeutete oder abklingende, sollte die Frage geklärt werden, wieviel Wasser einer Ratte zur Erzielung einer maximalen Wasserdiurese mit der Magensonde gegeben werden muß, und zu welchem Zeitpunkt nach der Wassergabe mit dem Eintritt der maximalen Wasserdiurese gerechnet werden kann. Nun hat sich der Brauch eingebürgert (Ginsburg 1951), die Geschwindigkeit der Diurese zu irgendeinem Zeitpunkt nach der ein- oder mehrmaligen oralen Gabe von Wasser nicht auf die ursprünglich gegebene Wassermenge, sondern auf die zum Zeitpunkt der Messung der Wasserdiurese noch im Organismus vorhandene, d. h. noch nicht im Harn ausgeschiedene Menge des durch Magensonde gegebenen Wassers zu beziehen. Dieser Anteil des oral gegebenen Wassers soll hier als *Überschußwasser* bezeichnet werden; die von Untersuchern englischer Sprache (Ginsburg 1951; Stein, Jinks u. Mirsky 1952) gebrauchte Bezeichnung „load" oder ein deutsches Äquivalent dazu soll wegen der Gefahr einer Verwechslung mit dem Begriff

* Mit Unterstützung der Deutschen Forschungsgemeinschaft.

des „renal tubular load" vermieden werden. Eine Berechtigung, die Diuresegeschwindigkeit in Abhängigkeit vom *Überschußwasser* auszudrücken, besteht nur dann, wenn eine solche Abhängigkeit tatsächlich nachgewiesen werden kann. Es wurde daher untersucht, ob und in welchem Bereich die Wasserdiurese eine Funktion der Menge des *Überschußwassers* ist.

Weiterhin sollte geklärt werden, ob die maximale, durch Steigerung der oralen Wassergabe erreichbare Diuresegeschwindigkeit durch die Menge des vorhandenen funktionsfähigen Nierenparenchymgewebes begrenzt wird. Nur wenn das der Fall wäre, könnte jede Steigerung der Geschwindigkeit der Wasserdiurese ohne weiteres als Steigerung der Wasserausscheidungs*fähigkeit* der Nieren gedeutet werden. — Schließlich wurde der Einfluß einer Reihe von vorbereitenden Eingriffen auf die Größe der Wasserdiurese der Ratte untersucht.

Methodik

Alle Versuche wurden an Ratten im Gewicht von 150—220 g durchgeführt; die Versuchsgruppen setzten sich jeweils zu gleichen Teilen aus männlichen und weiblichen Tieren zusammen. Da Geschlechtsunterschiede in keiner der Versuchsanordnungen nachgewiesen werden konnten, werden die Werte jeweils für beide Geschlechter zusammen ausgerechnet und angegeben. Die Messungen der Diuresegeschwindigkeit erfolgten immer zwischen 8 und 14 Uhr vormittags an Tieren, denen am Abend vorher das Futter entzogen, aber Wasser ad libitum gelassen worden war. Wasser wurde mit einer starren Magensonde gegeben. Die Diuresemessungen wurden immer bei konstanter Temperatur von 28 $\pm$ 2° C ausgeführt. Die Harnsammlung erfolgte in Diuresekäfigen, für die der Verdunstungsverlust bei verschiedenen Diuresegeschwindigkeiten vorher durch Aufspritzen von Wasser ermittelt worden war. Die gemessenen Diuresen wurden jeweils den Verdunstungsverlusten entsprechend korrigiert. Die Versuche wurden zu verschiedenen Jahreszeiten zwischen März 1954 und März 1957 ausgeführt.

Abhängigkeit der Diuresegeschwindigkeit von der Menge des Überschußwassers. Die Menge des *Überschußwassers* wurde auf 3 verschiedene Arten variiert (siehe unten unter a, b und c). Da sich in Vorversuchen gezeigt hatte, daß die Diuresen innerhalb der ersten 20 min nach einer Wassergabe mit der Magensonde regellos streuen, wurden Diuresemessungen bei allen 3 Variationsarten nie früher als 20 min nach der jeweils letzten Wassergabe vorgenommen. Außerdem wurden immer nur innerhalb der ersten 90 min des Aufenthalts der Tiere in den Diuresekäfigen ermittelte Werte zu den Berechnungen herangezogen.

a) Variation des *Überschußwassers* durch einmalige Gabe verschieden großer Wassermengen: Von 30 Ratten erhielten je 6 mit der Magensonde 2,0, 4,0, 6,0, 8,0 oder 10,0 ml destilliertes Wasser. 20 min nach der „Wässerung" wurde die Blase durch Ausdrücken (♀) oder Zug am proximalen Schwanzende (♂) entleert; als Überschußwasser wurde die gegebene Wasser- minus die bis dahin ausgeschiedene Harnmenge registriert. Während der darauffolgenden 20 min wurde die Diurese gemessen.

b) Progressive Steigerung der Menge des *Überschußwassers.* Je 40 Ratten erhielten mit der Magensonde 20 min vor Versuchsbeginn unabhängig vom Körpergewicht ungefähr 5,0 ml destilliertes Wasser und wurden in Diuresekäfige gebracht. 10 min später wurde die Blase geleert, die Harnmenge gemessen und mit der

Magensonde so viel destilliertes Wasser nachgegeben, daß die Menge des *Überschußwassers* weitere 20 min später etwa 3,0 ml betrug. 20 min nach dieser zweiten Wässerung wurde wiederum die Blase geleert, das tatsächlich vorhandene *Überschußwasser* errechnet und in den folgenden 10 min die Diurese gemessen. Dann wurde erneut durch die Magensonde so viel destilliertes Wasser nachgegeben, daß das *Überschußwasser* weitere 20 min später ungefähr 6,0 ml betrug; nach dieser Zeit wurde wiederum die Blase geleert und 10 min lang die Diurese gemessen. Dann wurde erneut so viel Wasser nachgegeben, daß weitere 20 min später das *Überschußwasser* ungefähr 9,0 ml betrug, zu diesem Zeitpunkt die Blase geleert und wiederum 10 min lang die Diurese gemessen. Dann wurde wiederum genug Wasser nachgegeben, um nach weiteren 20 min eine *Überschußwasser*menge von ungefähr 12,0 ml zu erreichen, und zu diesem Zeitpunkt erneut tatsächlich vorhandenes *Überschußwasser* und Diuresegeschwindigkeit in den folgenden 10 min bestimmt. — Der gleiche Versuch wurde mit weiteren 40 Ratten wiederholt, die zunächst 50,0 ml pro kg Körpergewicht destilliertes Wasser mit der Magensonde erhielten und dann nach den angegebenen Zeiträumen auf ein *Überschußwasser* von zunächst ungefähr 6,0 ml/Ratte, dann ungefähr 10,0 ml, dann ungefähr 13,0 ml und schließlich ungefähr 16,0 ml eingestellt wurden. Auch hier wurden die Diuresen jeweils von der 20. bis zur 30. min nach jeder Wassergabe gemessen. Die von jeder einzelnen Ratte in diesen Versuchen erhaltenen vier Werte wurden für die statistische Auswertung als voneinander unabhängig angesehen, nachdem sich herausgestellt hatte, daß die Streuungen innerhalb der Werte von einer Ratte zu verschiedenen Zeitpunkten nicht geringer waren als die Streuungen zwischen verschiedenen Ratten zum gleichen Zeitpunkt.

c) Progressives Abfallen der Menge des *Überschußwassers*. Insgesamt 175 Ratten erhielten unabhängig vom Körpergewicht zunächst gleichzeitig mit dem Einsetzen in die Diuresekäfige 10,0 ml destilliertes Wasser durch die Magensonde und weitere 10 min später nochmals 8,0 ml destilliertes Wasser. 20 min nach der 2. Wassergabe und von da ab in 10 min-Abständen bis zur 140. min nach der 2. Wassergabe wurde die Blase entleert. Für die 30., 50., 70. und 90. min nach der 2. Wassergabe wurde jeweils die Menge des *Überschußwassers* berechnet und der Diurese der folgenden 10 min gegenübergestellt. Auch hier wurden die jeweils durch mindestens eine Harnsammelperiode voneinander getrennten Werte als voneinander unabhängig angesehen.

Die aus allen 3 Versuchsanordnungen erhaltenen Werte wurden nach der Menge des *Überschußwassers* in Klassen geordnet; es ergaben sich für die Klasse von 0—0,9 ml/Ratte 37 Werte; für 1,0—1,9 ml 25 Werte; für 2,0—2,9 ml 45 Werte; für 3,0—3,9 ml 45 Werte; für 4,0—4,9 ml 37 Werte; für 5,0—5,9 ml 36 Werte; für 6,0—6,9 ml 47 Werte; für 7,0—7,9 ml 54 Werte; für 8,0—8,9 ml 40 Werte; für 9,0—9,9 ml 55 Werte; für 10,0—10,9 ml 66 Werte; für 11,0—11,9 ml 60 Werte; für 12,0—12,9 ml 73 Werte; für 13,0—13,9 ml 66 Werte; für 14,0—14,9 ml 77 Werte; für 15,0—15,9 ml 50 Werte; für 16,0—16,9 ml 29 Werte; für 17,0—17,9 ml 22 Werte. Für jede dieser Klassen wurde der Mittelwert und die Standardabweichung des Mittelwerts der Diurese der folgenden 10 min errechnet und in ml/Ratte/Std ausgedrückt.

Bestimmung und Berechnung des „echten Überschußwassers"

Das „*Überschußwasser*" zu irgendeinem Zeitpunkt nach der oralen Gabe von Wasser setzt sich nach der Definition aus 2 Komponenten zusammen, nämlich einerseits der noch in den Lumina des Magen-Darm-Trakts liegenden, d. h. noch nicht resorbierten Wassermenge, und andererseits der resorbierten, aber noch nicht im Harn ausgeschiedenen zusätzlichen Wassermenge. Der letztere Anteil soll im folgenden als *echtes Überschußwasser* bezeichnet werden, dessen Menge zu verschiedenen

Zeitpunkten nach einer größeren oralen Wassergabe in folgender Weise bestimmt wurde: 38 Ratten erhielten zunächst 10 ml/Ratte, 10 min später weitere 8,0 ml/Ratte destilliertes Wasser mit der Magensonde. Die Tiere wurden gleichzeitig mit der ersten Wassergabe in Diuresekäfige gesetzt; die Harnmenge wurde von diesem Zeitpunkt bis zur Tötung gemessen. 30, 50, 70, 90, 110 oder 130 min nach der zweiten Wassergabe wurden 8, 8, 7, 6, 6 oder 3 Tiere in leichter Äthernarkose durch Entblutung aus den Carotiden getötet. Nach Eröffnung der Leibeshöhlen wurden der Magen, der Dünndarm und der Dickdarm schnell getrennt an beiden Enden abgebunden, herausgenommen und gewogen. Dann wurden die Viscera der Länge nach aufgeschnitten, der Inhalt sorgfältig und schnell in je ein Schälchen ausgestrichen und die übrigbleibenden Magen- bzw. Dünndarm- oder Dickdarmwände erneut gewogen. Die Differenz der beiden Gewichte ergab den Gesamtinhalt des Organs. Der ausgestrichene Inhalt wurde gleichfalls sofort gewogen; im Anschluß daran wurde sein Wassergehalt durch Trocknen im Trockenschrank bei 110°C bis zur Gewichtskonstanz (48—72 Std) bestimmt; aus Gesamtinhalt und Wassergehalt des Inhalts wurde die Wassermenge in den einzelnen Anteilen des Magen-Darm-Trakts berechnet. Zur Bestimmung der Wassermengen im Magen-Darm-Trakt von Tieren, denen oral kein zusätzliches Wasser gegeben worden war, wurden 12 ganz gleichartig vorbehandelte Ratten ohne „Wässerung" in gleicher Weise getötet und aufgearbeitet. Das *echte Überschußwasser* wurde für jedes Tier nach der folgenden Formel errechnet:

Echtes Überschußwasser = *Überschußwasser* — (Wasser im Magen + Wasser im Dünndarm + Wasser im Dickdarm) + Mittelwert von (Wasser im Magen + Wasser im Dünndarm + Wasser im Dickdarm) der nicht „gewässerten" Kontrolltiere.

Die so berechneten Werte für das *echte Überschußwasser* wurden als Prozent des Gesamt*überschußwassers* ausgedrückt und in Abhängigkeit von der seit der Wassergabe verstrichenen Zeit bzw. dem Logarithmus der Zeit dargestellt.

Abhängigkeit der Diurese vom echten Überschußwasser. Da es nicht möglich ist, für ein einzelnes Versuchstier die Menge des tatsächlich vorhandenen *echten Überschußwassers* vor einer Diureseperiode zu bestimmen, wurde in einer größeren Reihe von Diureseversuchen an Tieren, die mit der Magensonde 10 ml und 10 min später nochmals 8 ml destilliertes Wasser erhalten hatten, das vorhandene *echte Überschußwasser* aus der festgestellten Abhängigkeit (siehe Ergebnisse) des Verhältnisses *echtes Überschußwasser*: *Überschußwasser* in Abhängigkeit von der Zeit nach der Wassergabe errechnet. In insgesamt 175 Einzelversuchen an 175 Tieren wurde auf diese Weise das *echte Überschußwasser* 30, 50 und 70 min nach der zweiten Wassergabe bestimmt und der Diurese der darauf jeweils folgenden 10 min gegenübergestellt. Die Diuresewerte, die wiederum in ml/Ratte/Std ausgedrückt wurden, wurden nach der gefundenen Menge des *echten Überschußwassers* in Klassen eingeteilt, für die jeweils Mittelwerte und Standardabweichungen der Mittelwerte errechnet wurden. Den im Ergebnisteil angegebenen Werten liegen für die Klasse von 0—0,9 ml/Ratte 34 Einzelwerte, für 1—1,9 ml 28, für 2—2,9 ml 52, für 3,0 bis 3,9 ml 38, für 4,0—4,9 ml 33, für 5,0—5,9 ml 13, für 6,0—6,9 ml 19, für 7,0—7,9 ml 42, für 8,0—8,9 ml 85, für 9,0—9,9 ml 84, für 10,0—10,9 ml 60 und für mehr als 11,0 ml 36 Diurese-Einzelwerte zugrunde.

Bestimmung der „Maximaldiurese". Als *Maximaldiurese* soll im folgenden die größte, durch Steigerung der Menge des *Überschußwassers* bei akuter Wässerung mit der Magensonde erzielbare Diuresegeschwindigkeit bezeichnet werden. Zu ihrer Bestimmung erhielten 175 Ratten zunächst 10,0 ml und 10 min später nochmals 8,0 ml/Ratte destilliertes Wasser mit der Magensonde. Die von der ersten Wassergabe ab bis 20 min nach der zweiten Wassergabe ausgeschiedene Harnmenge wurde gemessen und verworfen. Von der 20. min nach der zweiten Wassergabe ab wurde

120 min lang alle 10 min eine möglichst vollständige Blasenentleerung in der beschriebenen Weise erzwungen. Die Harnmengen wurden in 10 min-Perioden gemessen. Zum Ausgleich von Fehlern, die durch mangelhafte Blasenentleerung während einer 10 min-Periode und eine dadurch vorgetäuschte größere Diurese der folgenden 10 min-Periode entstehen könnten, wurde die *Maximaldiurese* nicht einfach aus dem größten beobachteten 10 min-Wert errechnet, sondern es wurden diesem größten 10 min-Wert jeweils die Diuresen der zwei unmittelbar vorangehenden und einer auf ihn folgenden 10 min-Perioden zugerechnet; die in den insgesamt 40 min ausgeschiedene Harnmenge wurde dann in ml/Ratte/Std umgerechnet.

Gesamtwasserausscheidung. Als Gesamtwasserausscheidung wurde die nach einer oralen Wassergabe von 10 + 8 ml vom Zeitpunkt der ersten Wassergabe ab innerhalb von 150 min ausgeschiedene Wassermenge bezeichnet.

Mineralausscheidung. In dem zwischen der 20. und der 140. min nach der zweiten Wassergabe ausgeschiedenen Harn wurden die Konzentrationen von Natrium und Kalium nach geeigneter Verdünnung flammenphotometrisch (Flammenphotometer-Zusatzgerät zum Beckman-DU-Spektrophotometer) und die Konzentration von Chlorid merkurimetrisch (Kuschinsky u. Langecker 1947) bestimmt. Die Ausscheidungen wurden in mÄqu/Ratte/Std umgerechnet und mit früher bestimmten Werten bei gleich vorbehandelten durstenden Ratten (Brunner, Kuschinsky u. Peters 1956b) verglichen.

Partielle Nephrektomien. 20 Ratten aus der Gruppe der Tiere, bei denen die Diurese nach oraler Gabe von 10 + 8 ml destillierten Wassers untersucht worden war, wurden in Äthernarkose einseitig nephrektomiert. Am 3. und am 14. Tag nach der einseitigen Nephrektomie wurde die Diurese nach Gabe der gleichen Wassermenge untersucht. Am 16. Tag nach der einseitigen Nephrektomie wurde bei 10 Tieren nach sorgfältigem Abpräparieren der Nebennieren der obere Nierenpol durch einen außen um die Nierenkapsel geschlungenen Faden derart abgebunden, daß etwa $^1/_3$ der gesamten Nierensubstanz abgetrennt wurde; der größte Teil des abgebundenen Nierenstücks wurde dann excidiert: „$^4/_6$-Resektion". Bei den übrigen 10 Tieren wurde sowohl der obere als auch der untere Nierenpol der zurückgebliebenen Niere auf diese Weise reseziert, so daß ungefähr $^2/_3$ des Parenchyms der einen verbliebenen Niere ausgeschaltet wurde: „$^5/_6$-Resektion". Sowohl die bei der ersten Operation entfernte ganze Niere als auch die bei der zweiten Operation entfernten Nierenstückchen wurden sofort nach Entnahme gewogen. 4 und 23 Tage nach der $^4/_6$- oder $^5/_6$-Resektion der zurückgebliebenen Niere wurde wiederum die Wasser- und Mineralausscheidung nach Gabe von 10 + 8 ml Wasser untersucht.

Einfluß einer einmaligen Blutentnahme. Bei 16 Ratten wurden *Maximaldiurese*, Wassergesamtausscheidung und Mineralausscheidung bestimmt und im Anschluß daran durch Abschneiden des Schwanzes 0,5—2,0 ml Blut entnommen. Der Hämoglobingehalt des entnommenen Blutes wurde als reduziertes Hämoglobin photometrisch bestimmt. 6 Tage nach der Blutentnahme wurde wiederum die Wasser- und Mineralausscheidung untersucht und im Anschluß daran erneut eine Blutprobe zur Hämoglobinbestimmung entnommen.

Versuche zur Steigerung der Wasserausscheidung nach oraler Wassergabe durch „Training". Bei 16 Ratten wurden *Maximaldiurese*, Wasser- und Mineralausscheidung nach oraler Wassergabe bestimmt. Dann erhielt je die Hälfte der Tiere täglich mit der Magensonde entweder 10 ml destilliertes Wasser oder 10 ml 0,9% NaCl-Lösung. Am 12. Tag wurde erneut die Wasserdiurese untersucht. Vom 12. bis zum 21. Tag wurde den Tieren täglich mit der Magensonde im Abstand von 10 min 10 + 8 ml destillertes Wasser oder 10 + 8 ml 0,9% NaCl-Lösung gegeben. Am 22. Tag wurde wiederum die Mineralausscheidung bei Wasserdiurese geprüft. Während der „Behandlung" stand den Tieren Körnerfutter und Wasser ad libitum

zur Verfügung. — In einem entsprechenden *akuten* Trainingsversuch wurden Maximaldiurese, Wasser- und Salzausscheidung bei 30 Ratten gemessen. Von diesen 30 Ratten erhielten zwischen der 24. und der 48. Std nach der ersten Diuresebestimmung 10 Tiere 6mal 10,0 ml/Ratte destilliertes Wasser in 4-Std-Abständen bei gleichzeitigem freiem Angebot von Gerstenkörnerfutter und Wasser. 10 Tiere erhielten in gleicher Weise und zur gleichen Zeit 6mal 10,0 ml einer Salzlösung, die 0,6% NaCl + 0,25% NH_4Cl enthielt. Die übrigen 10 Tiere wurden als Kontrollen 6mal im 4-Std-Abstand mit der für die anderen Tiere benutzten Sonde leer sondiert. Genau 48 Std nach der ersten Untersuchung wurde die Wasserdiurese und Mineralausscheidung erneut bestimmt.

Berechnungen von Mittelwerten, Standardabweichungen der Mittelwerte, Prüfungen der Signifikanz des Unterschiedes zweier Mittelwerte mittels der 2-Gruppen-Streuungszerlegung, Berechnung von Regressionsgeraden und ihren Streuungen und Bestimmungen von Vertrauensgrenzen wurden nach konventionellen statistischen Methoden (Snedecor 1950) vorgenommen.

Ergebnisse

Abhängigkeit der Diuresegeschwindigkeit vom Überschußwasser und vom echten Überschußwasser. Mit steigenden Mengen *Überschußwasser* steigt

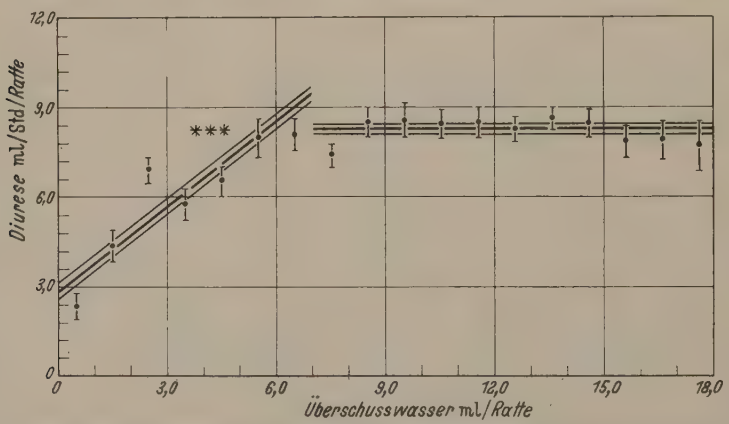


Abb. 1. *Abhängigkeit der Diuresegeschwindigkeit vom Überschußwasser. Überschußwasser*-Werte eingeteilt in Klassen von 0—0,9 ml/Ratte, 1,0—1,9 ml/Ratte, 2,0—2,9 ml/Ratte usw. Die Punkte mit vertikalen Haken bezeichnen für jede Klasse den Mittelwert $x \pm s_x$. Die Abhängigkeit der Diuresegeschwindigkeit von der *Überschußwasser*menge im Bereich von 0—6,9 ml/Ratte ist als Regressionsgerade wiedergegeben; die beiden dünn gezogenen Parallellinien bezeichnen den Bereich $\pm s_a$. Die Signifikanz der Regression ist

$$*** = P < 0{,}001 \left(P \text{ für } F = \frac{(Sxy)^2/Sx^2}{[Sy^2-(Sxy)^2/Sx^2]/n-2} \right)$$

Die horizontale Gerade mit den beiden Begleitgeraden bezeichnet den gemeinsamen Mittelwert $\pm s_x$ für die Diuresegeschwindigkeit bei *Überschußwasser*mengen zwischen 7,0 und 18,0 ml/Ratte

die Diuresegeschwindigkeit bis zu einer *Überschußwassermenge* von 6,0 bis 7,0 ml/Ratte an (Abb. 1). Eine weitere Steigerung der *Überschußwassermenge* hat keine weitere Beschleunigung der Diurese zur Folge. Wenn man nur die Diuresegeschwindigkeit für *Überschußwassermengen* von 0,1—6,9 ml/Ratte in Betracht zieht, läßt sich die Abhängigkeit der

Diurese vom *Überschußwasser* als lineare Regression darstellen. Die in Abb. 1 wiedergegebene Regressionsgerade ist nur insofern willkürlich, als die obere Grenze der in Betracht gezogenen Werte der unabhängigen Variablen (*Überschußwasser*) willkürlich festgelegt wurde; eine Verlegung dieser Grenze nach oben würde ihre Neigung geringer werden lassen. — Da die Diuresegeschwindigkeit mit steigendem *Überschußwasser* jenseits von 6—7 ml/Ratte nicht weiter ansteigt, läßt sich die maximale durch Steigerung der gegebenen Wassermenge erreichbare Diurese dann erzielen, wenn genügend Wasser gegeben wird, um die *Überschußwasser*menge in

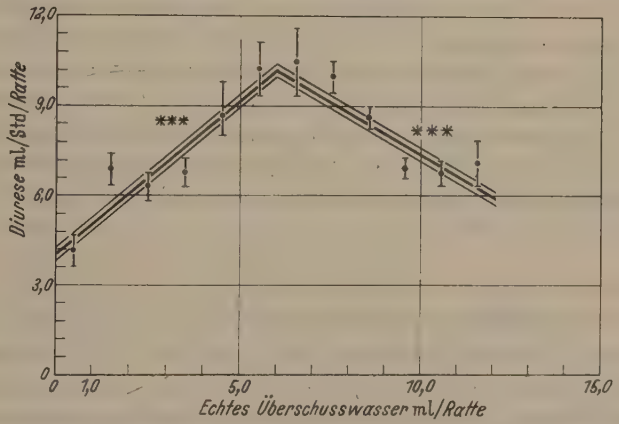


Abb. 2. *Abhängigkeit der Diuresegeschwindigkeit vom echten Überschußwasser.* Zeichen und Bezeichnungen wie Abb. 1; Versuchszahlen vgl. Methodik. Bezüglich der Definition des *echten Überschußwassers* vgl. Methodik (S. 3/4)

einem Zeitraum zwischen der 20. und 40. min nach der Wassergabe oder etwas länger oberhalb von 6—7 ml/Ratte zu halten. Wie schon bei der Besprechung der Methodik erwähnt wurde, lassen sich die Diuresewerte der ersten 20 min nach der Wassergabe wegen ihrer allzu großen Streuung von Tier zu Tier nicht verwerten; die Ursache für diese großen Streuungen dürften einerseits individuelle Schwankungen der Resorptionsgeschwindigkeit und andererseits durch den Eingriff der Wassergabe mit der Magensonde bedingte Störungen, wie z. B. Vasopressin- und Adrenalin-Ausschüttung sein.

Nach einer oralen Gabe von 10 + 8 ml destillierten Wassers nimmt der prozentuale Anteil des *echten Überschußwassers* (Definition s. Methodik, S. 3/4) am Gesamt*überschußwasser* im Lauf der Zeit zu und erreicht bei den einzelnen Tieren zwischen der 90. und der 130. min nach der zweiten Wassergabe (oder zwischen der 100. und der 140. min nach der ersten Wassergabe) 100%. Die Zunahme des Anteils erfolgt in annähernd linearer Abhängigkeit vom Logarithmus der Zeit nach der ersten

Wässerung. Die Abhängigkeit läßt sich durch die Regression $\hat{Y} = -71{,}77 + 82{,}25\ X$ wiedergeben. (In der Gleichung bedeutet X = log der Zeit nach der ersten Wassergabe in Minuten, $\hat{Y}$ = prozentualer Anteil des *echten Überschußwassers* am Gesamt*überschußwasser*; die Regression ist mit $P < 0{,}001$ berechtigt; die Standardabweichungen sind $s_a = 3{,}44$ und $s_b = 4{,}22$.)

Auf Grund dieser Abhängigkeit konnten für 175 Ratten zu verschiedenen Zeitpunkten nach der Gabe von 10 + 8 ml Wasser (vgl. Methodik) die Mengen des *echten Überschußwassers* errechnet werden. Wenn man nun (Abb. 2) die Diuresegeschwindigkeiten von 10-min-Perioden in Abhängigkeit vom *echten Überschußwasser* zu Beginn der jeweiligen Periode darstellt, findet man eine Zunahme der Diuresegeschwindigkeiten bis zu echten *Überschußwasser*mengen von 5,0—7,0 ml/Ratte. In diesem Bereich zeigen die Diuresegeschwindigkeiten eine annähernd lineare Abhängigkeit von der Menge des *echten Überschußwassers*. Einem Ansteigen der echten *Überschußwasser*menge über 7,0 ml entspricht ein gleichfalls von der steigenden Menge des *echten Überschußwassers* linear abhängiger Abfall der Diuresegeschwindigkeiten.

Bestimmung der maximalen durch Steigerung der per os gegebenen Wassermenge erreichbaren Diuresegeschwindigkeit = „Maximaldiurese"

Maximale Diuresegeschwindigkeiten werden bei *Überschußwasser*mengen zwischen 5 und 7 ml/Ratte und *echten Überschußwasser*mengen zwischen gleichfalls 5 und 7 ml/Ratte erreicht; andererseits erreicht der Anteil des *echten Überschußwassers* am Gesamt*überschußwasser* erst von der 90. min nach der letzten Wassergabe ab 100%. Zur Einleitung einer *maximalen Wasserdiurese* von etwa 1 Std Dauer muß daher so viel Wasser gegeben werden, daß um die 90. min nach der letzten oralen Wassergabe noch mindestens 5,0 ml *Überschußwasser* pro Ratte vorhanden sind. Andererseits soll die Wassergabe so groß sein, daß *echte Überschußwasser*mengen von 5—7 ml schon möglichst bald nach der Wässerung erreicht werden, um eine möglichst lange zeitliche Ausdehnung der *maximalen Diurese* zu bekommen. Der Anteil des *echten Überschußwassers* am Gesamt*überschußwasser* liegt nach der angegebenen Beziehung 20 min nach der letzten (zweiten) Wassergabe ungefähr bei 45%; dem optimalen Wert von 5—7 ml *echten Überschußwassers* würden daher zu diesem Zeitpunkt ungefähr 11—15 ml *Überschußwasser* entsprechen. Zur Erfüllung beider Forderungen wurde zur Bestimmung der *maximalen Diuresegeschwindigkeit* von ausgewachsenen Ratten eine Wassermenge von 18 ml/Ratte gewählt, die zur Schonung der Tiere auf 2 Einzelgaben von 10 und 8 ml im Abstand von 10 min verteilt wurde. Als Ausdruck der dann erreichten *maximalen Diuresegeschwindigkeit* konnte nicht die größte Harnausscheidung innerhalb von einer 10-min-Periode angesehen werden, weil sich eine

vollständige Blasenentleerung nicht immer absolut sicher erreichen läßt; die anzubringenden Korrekturen und die Berechnung der *Maximaldiurese* sind unter Methodik dargestellt worden. Da sich eine Korrelation zwischen den Diuresegeschwindigkeiten und dem Körpergewicht oder der Oberfläche der Ratten in der gewählten Gewichtsgruppe nicht nachweisen ließ, wurden die Werte weder auf das Körpergewicht noch auf die Körperoberfläche bezogen.

Die *maximale Diuresegeschwindigkeit* nach der oralen Gabe von 10 + 8 ml/Ratte destillierten Wassers betrug bei 175 Tieren *8,72 ± 0,20* ($\bar{x} \pm s_{\bar{x}}$) *ml/Ratte/Std.* Demgegenüber wurden nach der angegebenen Wassermenge innerhalb von 150 min von der ersten Wassergabe ab bei 144 Tieren dieser Gruppe *15,98 + 0,31 ml/Ratte/150 min* Harn ausgeschieden; das entspricht einer Diurese von 6,39 + 0,12 ml/Ratte/Std. Die maximale Ausscheidungsgeschwindigkeit wurde somit nur während eines Teils der Harnsammelperiode aufrecht erhalten. — Der Zeitpunkt der größten Diuresegeschwindigkeit, d. h. die größte, innerhalb der ganzen 150 min beobachtete Harnmenge in einer 10-min-Periode, lag bei den 150 Tieren dieser Reihe, bei denen er eindeutig bestimmt werden konnte, *53,6 ± 1,9 min* nach der zweiten Wassergabe.

Einfluß einer Blutentnahme auf die Maximaldiurese

8 Ratten wurden durch Abschneiden der Spitze des vorher in warmem Wasser erwärmten Schwanzes 1,6 ± 0,2 ml Blut entnommen. Das entnommene Blut enthielt 13,67 ± 0,25 g-% Hämoglobin. Am 6. Tag nach der Blutentnahme war der Hämoglobingehalt des Blutes mit 12,84 ± 0,33 g-% gerade noch ($P < 0{,}05$) erniedrigt. Die *Maximaldiurese* der Tiere betrug vor der Blutentnahme 7,40 ± 0,70 ml/Ratte/Std; am 6. Tag nach der Blutentnahme 8,30 ± 1,12 ml/Ratte/Std, hatte sich also nicht signifikant verändert. Die etwas größere Streuung der *Maximaldiurese* am 6. Tag nach der Blutentnahme schien nicht durch die Anämie bedingt zu sein; der Korrelationskoeffizient zwischen *Maximaldiurese* und Hämoglobingehalt des Blutes war mit $r = 0{,}30$ ($P < 0{,}05$) nicht signifikant.

Beeinflussung der Wasserdiurese durch Gewöhnung (Training)

Eine 11tägige Behandlung mit 10,0 ml/Tag/Ratte destillierten Wassers oder isotonischer Salzlösung hatte eine beträchtliche Beschleunigung der Wasserausscheidung zur Folge (Tab. 1). Dabei bestand kein Unterschied in der Wirkung einer Zwischenbehandlung mit Wasser oder mit isotonischer Salzlösung; auf die Wiedergabe der Streuungszerlegung kann verzichtet werden. Die Wirkung der 11tägigen Behandlung ließ sich durch weiteres Training mit 18,0 ml destillierten Wassers oder 18,0 ml isotonischer Salzlösung über eine Dauer von weiteren 10 Tagen nicht mehr steigern; die Diuresegeschwindigkeit nahm aber auch nicht wieder ab.

Tabelle 1. *Beeinflussung der Wasserdiurese durch tägliche Behandlung mit 10,0 ml/Ratte/Tag und später durch 18,0 ml/Ratte/Tag Wasser oder isotonischer Salzlösung*

	Maximaldiurese ml/Ratte/Std	Gesamtausscheidung ml/Ratte/150 min
„Norm"	8,72 ± 0,20 (175)	15,98 ± 0,31 (175)
Vorversuch	6,15 ± 0,67 (14)	13,65 ± 1,36 (14)
Nach 11 Tagen zu 10,0 ml/Tag .	12,15*** ± 0,70 (16)	18,34*** ± 0,70 (16)
Nach weiteren 10 Tagen zu 18,0 ml/Tag	10,50*** ± 0,72 (12)	17,67** ± 0,76 (12)
14 Tage später	8,41 ± 0,45 (12)	16,26 ± 0,68 (12)

Versuchsplan s. Methodik. Angegeben sind jeweils $\bar{x} \pm s_{\bar{x}}$; in Klammern die Versuchszahlen. Durch * bezeichnet sind die Signifikanzen der Unterschiede gegenüber dem Vorversuch. * = $P < 0{,}05$; ** = $P < 0{,}01$; *** = $P < 0{,}001$. Zwischen mit isotonischer Salzlösung und mit Wasser behandelten Tieren bestand kein Unterschied; die Einzelwerte sind daher nicht angegeben. Verschiedenheiten der Versuchszahlen entstanden durch 1. Ausschaltung aller Werte von Tieren, die im Diureseversuch Diarrhoen bekamen und 2. Tod bzw. sehr schlechten Allgemeinzustand von 4 Tieren nach der zweiten Behandlungsserie.

Tabelle 2. *Beeinflussung der Wasserausscheidung durch akutes Training mit 6 mal 10,0 ml/Ratte Wasser oder isotonischer Salzlösung*

	Maximaldiurese ml/Ratte/Std	Gesamtausscheidung ml/Ratte/150 min
Vorversuch	8,41 ± 0,41 (30)	16,26 ± 0,62 (27)
Nach 6 mal 10,0 ml/Wasser . .	10,62** ± 0,71 (9)	18,85** ± 1,08 (7)
Nach 6 mal 10,0 ml isoton. Salzlösung	12,07*** ± 0,85 (9)	19,27** ± 1,04 (9)
Nach 6 mal Leersondierung . .	7,25 ± 1,14 (10)	17,06 ± 1,35 (7)

Zeichen und Bezeichnungen wie in Tab. 1. Angegeben sind die Signifikanzen der Unterschiede gegenüber dem Vorversuch, die nach Ausschaltung der durch die Streuung zwischen den einzelnen Tieren bedingten Unterschiede (Paarung) errechnet wurden

Innerhalb von 14 Tagen nach Beendigung des täglichen Wasserdiurese-Trainings ging dagegen die Wasserausscheidungsgeschwindigkeit wieder auf den Normalwert — wenn auch nicht auf den ungewöhnlich niedrigen Ausgangswert der für diesen Versuch verwandten Tiergruppe — zurück.

Nahezu die gleiche Steigerung der Wasserdiuresegeschwindigkeit ließ sich durch 6 malige Gabe von 10,0 ml Wasser oder isotonischer Salzlösung innerhalb von 24 Std erzielen (Tab. 2); Salzlösung und Wasser waren bei der Behandlung gleich wirksam. Bei Kontrolltieren, die in den gleichen Abständen wie die mit Wasser behandelten Tiere leer sondiert wurden,

war die Wasserdiurese bei 2 Messungen innerhalb von 48 Std nicht unterschieden. Bestimmungen der *Maximaldiurese* können daher an den gleichen Tieren im Abstand von 2 Tagen wiederholt werden.

Der Einfluß von Parenchymresektionen auf die Wasserdiurese

Nach der Entfernung einer Niere trat weder am 3. noch am 14. Tag nach dem Eingriff eine signifikante Abnahme der *maximalen Diuresegeschwindigkeit* oder aber auch der Wasserdiurese innerhalb von 150 min nach der großen Wassergabe auf (Tab. 3). Die Mittelwerte scheinen zwar etwas niedriger zu liegen als vor der einseitigen Nephrektomie; die Unter-

Tabelle 3. *Einfluß von einseitiger Nephrektomie und Resektionen an der nach einseitiger Nephrektomie hypertrophierten verbliebenen Niere auf die Maximaldiurese und Gesamtwasserausscheidung nach oraler Gabe von 18,0 ml/Ratte destillierten Wassers*

	Maximaldiurese ml/Ratte/Std	Gesamtausscheidung ml/Ratte/150 min
Vor Resektionen	8,85 ± 0,42 (29)	14,53 ± 0,57 (29)
Nach einseitiger Nephrektomie:		
3. Tag	7,13 ± 0,37 (20)	13,76 ± 0,65 (20)
14. Tag	7,62 ± 0,44 (16)	14,11 ± 0,83 (16)
Nach $^4/_6$-Resektion:		
4. Tag	8,79 ± 0,71 (8)	15,50 ± 1,11 (8)
23. Tag	8,22 ± 0,46 (9)	15,83 ± 1,06 (9)
Nach $^5/_6$-Resektion:		
4. Tag	6,00** ± 0,51 (8)	11,82** ± 0,99 (8)
23. Tag	7,83 ± 0,88 (9)	13,77 ± 1,32 (9)

Angegeben sind jeweils Mittelwerte $\bar{x} \pm s_{\bar{x}}$; in Klammern Versuchszahlen. Die einseitig nephrektomierte Gruppe wurde nach Zufallskriterien aus den vor dem Versuch untersuchten 29 Tieren ausgesucht. Die Zuteilung zur nur am oberen Nierenpol oder an beiden Nierenpolen resezierten Gruppe erfolgte gleichfalls nach Zufallskriterien. Verschiedene Versuchszahlen erklären sich aus zufälligem Ausfall von Einzelwerten bzw. dem Auftreten von Diarrhoe; es wurde kein gemessener Wert ausgeschlossen. Einzelheiten s. Methodik. Bezeichnung der Signifikanzen der Unterschiede gegenüber den Werten vor der Resektion wie in Tab. 1

schiede sind aber beim Vergleich mit den Werten der gleichen Tiere vor dem Eingriff nicht signifikant. (Bei dem — weniger relevanten — Vergleich der Werte nach einseitiger Nephrektomie mit den Normalwerten einer großen Zahl intakter Ratten — Tab. 1 — würde sich eine zwar signifikante, aber relativ geringfügige Verringerung der Diuresegeschwindigkeit ergeben.) — Auch die zusätzliche Entfernung des oberen Nierenpols der inzwischen hypertrophierten verbliebenen Niere, bei der etwa $^1/_3$ der ganzen Niere reseziert wurde, führte nicht zu einer Einschränkung der Wasserausscheidungsfähigkeit: Gesamtausscheidung und *Maximaldiurese* waren ebenso hoch wie bei intakten Tieren.

Nur die Entfernung von $^2/_3$ des Gesamtgewichts der verbliebenen Niere („$^5/_6$-Resektion") senkte sowohl die *maximale Diuresegeschwindigkeit* als auch die Gesamtwasserausscheidung nach Gabe von 18,0 ml Wasser signifikant unter den Ausgangswert. Die *Maximaldiurese* war am 4. Tag nach dem zweiten Eingriff um etwa $^1/_3$ gesenkt. Auch diese Senkung der Wasserausscheidungsfähigkeit durch ausgedehnte Nierenparenchymresektion erwies sich als reversibel: am 23. Tag nach dem Eingriff war die Wasserausscheidungsfähigkeit nicht mehr signifikant von derjenigen nicht operierter Tiere unterschieden (Tab. 3).

Die Verringerung der Wasserausscheidungsfähigkeit der operierten Niere nach der $^5/_6$-Resektion war wahrscheinlich wirklich eine Folge des Nierenparenchymverlusts (und nicht des Operationstraumas); denn die Größe der *maximalen Wasserdiurese* am 4. Tag nach der Operation war dem Gewicht des entfernten Nierengewebes signifikant negativ korreliert. Der Korrelationskoeffizient betrug

$$r = -0{,}67\ (8).$$

Die Wahrscheinlichkeit für ein zufälliges Zustandekommen dieses Korrelationskoeffizienten ist $P < 0{,}01$.

Die Ausscheidung von Mineralien bei der Wasserdiurese

Bei der Wasserdiurese kommt es zu einer zwar geringfügigen, aber signifikanten Steigerung der Ausscheidung von Natrium-Ionen, während die Chloridausscheidung sogar auf mehr als das Doppelte der Ausscheidung im Durst zunimmt. In Tab. 4 sind die Ausscheidungen während

Tabelle 4. *Mineralausscheidung bei der Wasserdiurese und im Durst*

	Wasserdiurese	Durst
Na^+ µÄq/Std . . .	40* ± 2 (139)	34 ± 2 (129)
Cl' µÄq/Std . . .	77*** ± 4 (139)	40 ± 5 (129)
K^+ µÄq/Std . . .	22 ± 1 (139)	21 ± 1 (129)

Gleich vorbehandelte Ratten; 12 Std vor Beginn der Harnsammlung Nahrungsentzug, Wasser ad libitum. Harnsammlung bei Wasserdiurese von der 20. bis zur 140. min nach oraler Gabe von 18,0 ml/Ratte Wasser, bei der Durstdiurese 3 bis 9 Std lang ab Durstbeginn. Angegeben sind Mittelwerte $\bar{x} \pm s_{\bar{x}}$; alle Ausscheidungen in µÄq/Ratte/Std. Die Signifikanzen der Unterschiede bei Wasserdiurese und bei Durstdiurese sind wie bei Tab. 1 bezeichnet

der Wasserdiurese denen von bis zum Versuchsbeginn ganz gleich behandelten, aber anschließend während der Harnsammlung durstenden Tieren gegenübergestellt:

Die Kaliumausscheidung wird bei einer einmaligen Wasserdiurese nicht signifikant gesteigert.

Im chronischen Gewöhnungsversuch stieg zusammen mit der Wasserausscheidung auch der Chloridverlust bei der Wasserdiurese signifikant an; eine Zunahme der Natriumausscheidung ließ sich nicht sicher nachweisen, wohl aber eine signifikante geringe Steigerung des Kaliumverlusts (Tab. 5).

Tabelle 5. *Beeinflussung der Mineralausscheidung bei der Wasserdiurese durch längere Behandlung mit Wasser oder 0,9% NaCl-Lösung per Magensonde*

	µÄq/Ratte/Std		
	Na^+	K^+	Cl'
Vorversuch	39 ± 8 (14)	13 ± 3 (14)	37 ± 7 (14)
Nach 11 Tagen zu 10,0 ml/Tag	49 ± 8 (16)	16 ± 2 (16)	73* ± 12 (16)
Nach weiteren 10 Tagen zu 18,0 ml/Tag	51 ± 8 (12)	20* ± 2 (12)	64* ± 8 (12)

Versuchsanordnung s. Methodik. Angegeben sind Mittelwerte $\bar{x} \pm s_{\bar{x}}$. Bezeichnung der Signifikanzen der Unterschiede gegenüber dem Vorversuch wie in Tab. 1

Tabelle 6. *Mineralausscheidung im Harn bei der Wasserdiurese nach Nierenparenchymresektionen*

	µÄq/Ratte/Std		
	Na^+	K^+	Cl'
Norm	40 ± 2 (139)	22 ± 1 (139)	77 ± 4 (139)
Nach einseitiger Nephrektomie:			
3. Tag	20*** ± 2 (20)	11*** ± 2 (17)	28*** ± 3 (20)
14. Tag	36 ± 7 (15)	21 ± 3 (15)	41*** ± 7 (16)
Nach $^4/_6$-Resektion:			
4. Tag	13*** ± 3 (8)	18 ± 6 (8)	28*** ± 8 (8)
23. Tag	21*** ± 7 (9)	16 ± 2 (9)	46*** ± 7 (9)
Nach $^5/_6$-Resektion:			
4. Tag	7*** ± 2 (8)	24 ± 7 (8)	21*** ± 4 (8)
23. Tag	9*** ± 2 (9)	16 ± 4 (9)	31*** ± 5 (9)

Alle Angaben in µÄq/Ratte/Std. Zeichen und Bezeichnungen wie in Tab. 3

Mit der akuten Steigerung der Wasserausscheidungsfähigkeit durch mehrfache Gaben von Wasser oder isotonischer Salzlösung innerhalb von 24 Std wurde dagegen die Salzausscheidung im Harn nicht gesteigert.

Über die Beeinflussung der Mineralverluste im Harn bei der Wasserdiurese nach Nierenresektionen berichtet Tab. 6.

Aus den Werten geht hervor, daß nach einseitiger Nephrektomie sowie nach zusätzlicher Resektion des oberen Nierenpols bei gleichbleibender Wasserausscheidung nicht mehr, sondern weniger Natrium und Chlorid

ausgeschieden werden als bei intakten Tieren; gleich große Wasserausscheidungen sind also jetzt mit geringeren Salzverlusten verbunden. Nach $^5/_6$-Resektion sind die Salzverluste im Harn bei der Wasserdiurese sehr viel stärker als die Wasserausscheidungsfähigkeit der Nieren reduziert. Die Kaliumausscheidung im Harn bei der Wasserdiurese wird durch die Eingriffe an den Nieren nicht eindeutig beeinflußt.

Diskussion

Nach akuter Wassergabe mit der Magensonde folgt die Diuresegeschwindigkeit der Menge des *Überschußwassers* nur bis zu 5—7 ml *Überschußwasser*/Ratte. Bei größeren *Überschußwasser*mengen ist man daher nicht berechtigt, die Diurese in Abhängigkeit vom *Überschußwasser* auszudrücken. Solange unter diesen Bedingungen eine maximale Wasserausscheidung besteht, ist die Harnmenge pro Ratte und pro Zeiteinheit das mit der geringsten Streuung behaftete *Maß der Diurese*, das deshalb auch z. B. bei der Austestung von antidiuretisch wirkenden Substanzen angewandt werden sollte (Brunner, Kuschinsky u. Peters 1956b). Wir haben keinen Anhaltspunkt dafür gefunden, daß die Größe der maximalen Wasserdiurese dem Körpergewicht oder der Körperoberfläche der Ratten (im Bereich der untersuchten Tiere) korreliert sein könnte.

Die zur Bestimmung der *maximalen Wasserdiurese* nach oraler akuter Wässerung verwandte Wassermenge von 18,0 ml/Ratte mag bei Umrechnung auf andere Tierarten auf Kilogrammbasis recht hoch erscheinen. Sie liegt aber weit unter der von Ratten symptomlos vertragenen Wassermenge (Møller-Christensen 1950); außerdem haben wir in anderen Versuchen beobachten können, daß Ratten von gleicher Körpergröße nach Durst und Dehydratation bei plötzlich freiem Wasserangebot innerhalb von 15 min freiwillig 12—18 ml Wasser trinken.

Die in unserer Versuchsanordnung nach akuter Wassergabe per os ermittelten *maximalen Diuresegeschwindigkeiten* können nicht als allgemeingültige Maße der maximalen möglichen Wasserausscheidungsgeschwindigkeit durch die Rattenniere angesehen werden. So haben z. B. Kellogg, Burack u. Isselbacher (1954) bei Dauertropfinfusion mittels einer Magensonde bei Gabe von Wasser $2^1/_2$—3mal und bei Gabe von Ringer-Lösung sogar 4—5mal größere Diuresegeschwindigkeiten beobachtet, während mit einer ähnlichen Versuchsanordnung von Herken, Senft u. Wilutzky (1956) keine so großen Diuresegeschwindigkeiten gefunden wurden. Die hier geschilderten Versuche zur Steigerung der Wasserausscheidungsgeschwindigkeit durch Training der Versuchstiere wurden nicht zuletzt angestellt, um zu ermitteln, ob sich auf diese Weise ähnliche große Diuresen wie bei Kellogg u. Mitarb. (1954) erreichen ließen; die tatsächlich erreichte Steigerung der Diurese war aber nicht größer als die von Herken u. Mitarb. gefundenen Werte.

Eine Steigerung der Wasserausscheidungsgeschwindigkeit von Ratten nach wiederholten Wassergaben war auch unter anderen Versuchsbedingungen von Møller-Christensen (1950) gefunden worden. Die Größe der Salzverluste bei einer Steigerung der Wasserdiurese durch Gewöhnung scheint u. a. von Größe und zeitlicher Aufeinanderfolge der Wassergaben abzuhängen: Bei größeren oder schneller aufeinanderfolgenden Wassergaben nehmen die Chloridverluste bei der Wasserdiurese im Harn entweder ab (Møller-Christensen 1950) oder bleiben konstant (unsere Versuche mit wiederholter Wassergabe im 4-Std-Abstand innerhalb von 24 Std); bei langsamerer Aufeinanderfolge der Wassergaben nehmen die Chloridverluste im Harn bei der Wasserdiurese mit Steigerung der Wasserdiurese zu (unsere Versuche mit 10,0 bzw. 18,0 ml/Ratte/Tag über 21 Tage).

Die Geschwindigkeit der Wasserausscheidung nach akuter oraler Wässerung wird, wie die Resektionsversuche zeigen, nicht durch die Menge des vorhandenen Nierenparenchyms begrenzt. Da erst eine Resektion von ungefähr $^5/_6$ des gesamten bei einem normalen Tier vorhandenen Nierenparenchyms zu einer Einschränkung der Wasserausscheidungsgeschwindigkeit führt, muß damit gerechnet werden, daß von beiden intakten Nieren unter Umständen die 6fache Menge Wasser pro Zeiteinheit — also mehr als in den Versuchen von Kellogg, Burack u. Isselbacher — ausgeschieden werden könnte. Der begrenzende Faktor für die Geschwindigkeit der Wasserdiurese nach akuter oraler Wassergabe muß somit außerhalb und „vor" den Nieren liegen. Außerdem muß der Ausfall eines Teils des Nierenparenchyms nach Einleitung der Wasserdiurese den verbleibenden funktionstüchtigen Nierenteilen — wahrscheinlich auf dem Blutweg — „mitgeteilt" werden. Der begrenzende Faktor und der Weg der „Mitteilung" wird in weiteren Untersuchungen zu klären sein.

Der Abfall der Wasserausscheidungsgeschwindigkeit bei sehr hohen Werten des *echten Überschußwassers* kann vielleicht als Ausdruck einer beginnenden „Wasservergiftung" angesehen werden: er muß bei der gewählten Versuchsanordnung bei denjenigen Tieren auftreten, die bei normaler Wasserresorption aus dem Darm renal wenig Wasser ausscheiden.

Da die Wasserdiurese zu einer wesentlichen Steigerung der Chloridausscheidung führt, muß wiederholte Wasserdiurese eine Mineralverarmung des Organismus bewirken. Hierbei wird anscheinend Natrium besser konserviert als Chlorid. Wasserstöße scheinen somit eher einer chloruretische als eine natriuretische Maßnahme zu sein, wobei über die Zusammensetzung der mit dem Chlorid zusätzlich verlorenen Kationen nichts ausgesagt werden kann.

Auffällig ist die Tatsache, daß bei der geringen Einschränkung der Wasserdiurese, die eine $^5/_6$-Resektion des Nierenparenchyms mit sich bringt, die Na^+- und Cl'-Verluste im Harn während der Wasserdiurese

abnehmen, während unter diesen Bedingungen (Peters 1956) die Natrium-, Kalium- und Chloridausscheidung bei der Diurese frei nach Wunsch trinkender Tiere und im Durst zunehmen. Der Unterschied mag als weiterer Hinweis auf die grundsätzliche Verschiedenheit der Ruhe- und der Wasserdiurese gedeutet werden.

Summary

A large number of rats were given different volumes of distilled water by stomach tube, and the relation between the rate of diuresis and the water load was investigated. The rate of water diuresis increased with loads of up to 5.0 to 7.0 ml. water per rat. With larger water loads no further increase in the rate of diuresis was obtained.

In another series of experiments rats were hydrated by the administration of 10 + 8 ml. of water by stomach tube; the relation of the quantity of water actually absorbed from the gut to the total water load was found to increase as a linear function of the logarithm of the time passed after hydration.

The maximal rate of diuresis which can be obtained in a rat by a single water load (10 + 8 ml given within 10 min) was determined in rats given 18 ml water per animal by stomach tube. The calculation of the maximal rate of water diuresis obtained under these conditions is described. The maximal rate of water diuresis was 8.72 $\pm$ 0.20 ($x \pm s_{\bar{x}}$) ml/rat/hour and it was reached 53.6 $\pm$ 1.9 min after the total dose of water.

The loss of approximately 1.5 ml of blood had no significant influence on the rate of water diuresis. This rate could be considerably increased either by repeated administrations of 10 ml water (or isotonic NaCl solution) per rat per day during 10 days or by administration of the same total volume of water or isotonic saline within 48 hours.

Unilateral nephrectomy and the subsequent excision of one third of the remaining kidney had no influence on the rate of water diuresis after a single oral water load. Only when $^5/_6$ of the renal parenchyma present in normal rats were eliminated a depression of the maximal rate of water diuresis occured. This depression disappeared within 20 days as a consequence of the compensatory enlargement of the remaining kidney. — The rate of water diuresis therefore does not appear to be limited by the amount of renal parenchyma present in the animal.

Water diuresis caused a considerable increase in chloride excretion and a slight increase in sodium excretion as compared to the salt excretions of similarily treated rats which were not given water. In unilaterally nephrectomized rats and after subtotal nephrectomy the salt losses accompanying water diuresis were smaller than in normal control animals.

Für ausgezeichnete technische Mitarbeit danken wir Fräulein R. Engel.

Literatur

Anselmino, K. J., F. Hoffmann and W. P. Kennedy: The relation of hyperfunction of the posterior lobe of the hypophysis to eclampsia and nephropathy of pregnancy. Edinburgh Med. J. **39**, 376 (1932).

Baïsset, A., R. Huron et L. Lareng: Méthode de dosage des substances antidiurétiques dans le sérum. J. de Physiol. **46**, 671 (1954).

Birnie, J. H., R. Jenkins, W. J. Eversole and R. Gaunt: An antidiuretic substance in the blood of normal and adrenalectomized rats. Proc. Soc. exper. Biol. a. Med. **70**, 83 (1949).

Brunner, H., G. Kuschinsky u. G. Peters: Der Einfluß von Oxytocin auf die renale Wasser- und Salzausscheidung der Ratte. Arch. exper. Path. u. Pharmakol. **228**, 457 (1956a).

Brunner, H., G. Kuschinsky u. G. Peters: Die Wirkung von Vasopressin auf die renale Wasser- und Salzausscheidung der Ratte bei Veränderungen der Salzkonzentration des Trinkwassers und nach Nierenparenchymresektionen. Arch. exper. Path. u. Pharmakol. **228**, 434 (1956b).

Burn, J. H.: Estimation of the antidiuretic potency of pituitary (posterior lobe) extract. J. of Pharmacy a. Pharmacol. **4**, 517 (1931).

Crawford, J. D., and B. Pinkham: An assay method for antidiuretic hormone based on a more specific response index. Endocrinology (Springfield, Ill.) **55**, 521 (1954).

Gilman, A., and L. Goodman: The secretory response of the posterior pituitary to the need for water conservation. J. Physiol. **90**, 113 (1937).

Ginsburg, M.: A method for the assay of antidiuretic activity. Brit. J. Pharmacol. **6**, 411 (1951).

Ginsburg, M., and H. Heller: The antidiuretic assay of vasopressin by intravenous injection into unanaesthetized rats. J. of Endocrin. **9**, 267 (1953).

Ham, G. C., and E. M. Landis: A comparison of pituitrin with the antidiuretic substance found in human urine and placenta. J. Clin. Invest. **21**, 455 (1942).

Herken, H., G. Senft u. H. Wilutzky: Die Erzeugung von Natrium- und Wasserretentionen zur Prüfung der Diuretica. Arch. exper. Path. u. Pharmakol. **229**, 123 (1956).

Holeček, V., H. Polák u. M. Jirásek: Eine neue Modifikation der Adiuretin-Bestimmung. Endokrinologie **32**, 38 (1954).

Jeffers, W. A., M. M. Livezey and J. H. Austin: A method for demonstrating an antidiuretic action of minute amounts of pitressin: statistical analysis of results. Proc. Soc. exper. Biol. a. Med. **50**, 184 (1942).

Kellogg, R. H., W. R. Burack and K. J. Isselbacher: Comparison of diuresis produced by isotonic saline solutions and by water in rats studied by a "steady state" method. Amer. J. Physiol. **177**, 27 (1954).

Kuschinsky, G., u. H. Langecker: Eine mercurimetrische Bestimmung des Chlorids im Harn. Biochem. Z. **318**, 164 (1947).

Langecker, H., u. G. Kuschinsky: Diurese, Filtration und Sekretion der Niere unter dem Einfluß verschiedener Pharmaka. V. Mitteilung. Die diuretische Wirkung organischer Quecksilberverbindungen bei Hund, Ratte und Maus unter dem Einfluß des Atropins. Arch. exper. Path. u. Pharmakol. **204**, 742 (1947).

Lewis, A. A. G.: Observations on the antidiuretic substance in human serum. J. Clin. Endocrin. a. Metab. **13**, 769 (1953).

Møller,-Christensen, E.: Obersvations into the diuresis of rats after period ingestion of massive doses of water. Acta physiol. scand. (Stockh.) **20**, 307 (1950).

Peters, G.: Die experimentelle Niereninsuffizienz nach Parenchymresektionen. Vortrag, Mainz, Medizin. Gesellschaft, 23. März 1956; ref. Münch. med. Wschr. **1956**, 1007.

Ralli, E. P., L. G. Raisz, S. H. Leslie, M. E. Dumm and B. Laken: Evidences for more than one antidiuretic substance in pitressin. Amer. J. Physiol. **163**, 141 (1950).

Robinson, F. H., and L. E. Farr: The relation between clinical edema and the excretion of an antidiuretic substance in the urine. Ann. Int. Med. **14**, 42. (1940).

Snedecor, G. W.: Statistical Methods Applied to Experiments in Agriculture and Biology, 4th Edition. The Iowa State College Press, Ames, Iowa. 1950.

Stein, M., R. Jinks and I. A. Mirsky: The bioassay of pitressin and antidiuretic substances in blood and urine. Endocrinology (Springfield, Ill.) **51**, 492 (1952).

Szentgyörgyi, D., u. M. Békés: Biologische Wertbestimmung des antidiuretischen Hypophysenhormons. Acta physiol. (Budapest) **2**, 519 (1951).

Valeri, G. M., e M. Perrini: Influenza di vari ormoni sulla diuresi da carico idrico nei ratti e sulle sostanze antidiuretiche urinarie. Fol. endocrinol. (Livorno) **6**, 439 (1953).

Professor Dr. G Kuschinsky, Pharmakolog. Inst. d. Univ. Mainz

Arch. exper. Path. u. Pharmakol., Bd. 233, S. 19—38 (1958)

Aus dem Pharmakologischen Institut der Universität Mainz
(Direktor: Professor Dr. G. Kuschinsky)

Die Verteilung von Wasser, Natrium und Kalium im Organismus der Ratte nach einer großen oralen Wassergabe

Von
H. Brunner, G. Kuschinsky und G. Peters*

Mit 4 Textabbildungen

(Eingegangen am 29. Juli 1957)

Nachdem sich herausgestellt hatte (Brunner, Kuschinsky u. Peters 1958), daß nach akuter oraler Wassergabe die Geschwindigkeit der Diurese bis zu einer Grenze von 5,0—7,0 ml/Ratte von der Menge des Überschußwassers abhängig ist, bei größeren Wasserbelastungen aber nicht mehr zunimmt, und daß die Diuresegeschwindigkeit nicht von der Menge des vorhandenen funktionsfähigen Nierenparenchyms begrenzt wird, waren die folgenden Fragen zu klären:

1. Ist der begrenzende Faktor für die Geschwindigkeit der Wasserdiurese die Geschwindigkeit der Wasserresorption aus dem Magen-Darm-Trakt, oder die Wasseraufnahmefähigkeit des Blutes oder irgendeines Speicherungsorgans?

2. In welchen Körpergeweben wird resorbiertes Wasser gespeichert, bevor es durch die Nieren ausgeschieden wird?

3. Nach dem Ausfall von Teilen des Nierenparenchyms übernimmt der übriggebliebene Nierenteil pro Gewichtseinheit eine sehr viel größere Wasserausscheidung als vorher. Auf welchem Weg wird das übriggebliebene Nierenparenchym zur Steigerung der Wasserausscheidung angeregt?

4. Treten beim Durchgang großer Wassermengen durch den Körper außer den beschriebenen mäßigen Mineralverlusten Mineralverschiebungen im Organismus auf?

5. Beeinflußt der Ausfall von Teilen des Nierenparenchyms die Wasser- und Mineralverteilung im Organismus?

Zur Beantwortung dieser Fragen wurde bei einer größeren Reihe von Ratten vor und zu verschiedenen Zeitpunkten nach einer großen Wassergabe der Wasser-, Natrium- und Kaliumgehalt einer Reihe von Geweben und Organen sowie Wasser-, Natrium-, Kalium-, Chlorid-, Hämoglobin-, Gesamteiweißgehalt des Blutes und der Hämatokritwert bestimmt.

* Mit Unterstützung der Deutschen Forschungsgemeinschaft.

Methodik

Insgesamt 75 Ratten im Gewicht von 170—300 g (40 ♀ und 35 ♂) wurden entweder ohne Wassergabe oder zu verschiedenen Zeitpunkten nach der Gabe von 10 + 8 ml destillierten Wassers mit der Magensonde (im Abstand von 10 min) in leichter Äthernarkose aus beiden Carotiden entblutet. Die Tiere erhielten bis zum Vorabend der Tötung Latz-Rattenfutter und Leitungswasser ad libitum, vom Abend bis zum nächsten Tag nur noch Leitungswasser ad libitum. Die ohne Wassergabe entbluteten Tiere wurden für 10—30 min vor der Entblutung in einen Raum von 28° C gebracht; diejenigen Tiere, die Wasser erhielten, wurden von der Wässerung bis zur Entblutung in Diuresekäfige in einem Raum bei 28° C eingesetzt; die Harnmenge von der Wässerung bis zur Entblutung wurde gemessen. Entblutet wurden 17 Tiere ohne Wassergabe, 8 Tiere 40 min, 14 Tiere 60 min, 7 Tiere 80 min, 12 Tiere 100 min, 7 Tiere 120 min und 10 Tiere 140 min nach der ersten Wassergabe. Das Blut einer Ratte wurde jeweils über 0,2 ml = 1000 E Heparin[1] aufgefangen.

Eine Probe wurde sofort gewogen und zur Bestimmung des Wassergehalts bis zur Gewichtskonstanz (48—72 Std) bei 100—110° C getrocknet. Eine weitere Probe wurde zur Bestimmung des Hämatokritwertes im Hämatokritröhrchen 10 min lang bei 3000 Umdrehungen zentrifugiert. Im Plasma wurden Natrium, Kalium und Chlorid nach früher beschriebenen Methoden (Brunner, Kuschinsky, Münchow u. Peters 1956), der Gesamteiweißgehalt nach dem Biuretverfahren von Kingsley in der Modifikation von Reinhold (1953) bestimmt. Eichkurven für das Biuretverfahren wurden mit Hilfe von Verdünnungen aus Menschenplasma und aus dem vereinigten Plasma von 5 Ratten der später zu den Versuchen verwandten Gruppe aufgestellt, nachdem der Eiweißgehalt der Proben nach dem Makro-Kjeldahl-Verfahren bestimmt worden war. Die Eichkurve für menschliches Plasma unterschied sich nicht von derjenigen für Rattenplasma. In einer weiteren Blutprobe wurde das Hämoglobin als reduziertes Hämoglobin photometrisch bestimmt; die Photometer-Eichkurve wurde an Hand von mehreren Blutproben mit bekanntem Gesamteisengehalt (Bestimmung nach Wong) aufgestellt.

Sofort nach der Entblutung wurde die Bauchhöhle eröffnet, Magen, Dünndarm und Dickdarm getrennt jeweils an beiden Enden abgebunden, herausgenommen und gewogen. Jedes der drei Organe wurde dann der ganzen Länge nach aufgeschnitten; der Inhalt wurde sorgfältig ausgedrückt und in einem Schälchen aufgefangen. Das vom Inhalt befreite Organ wurde erneut gewogen; die Differenz zwischen dem ersten und dem zweiten Gewicht als Gesamtgewicht des Inhalts angenommen. Nach dieser Wägung wurde eine Probe der Wand des Organs mit der Schere fein zerkleinert und der Wassergehalt von Wand und Inhalt getrennt wiederum durch Trocknen bis zur Gewichtskonstanz bei 100—110° C bestimmt. Aus Wassergehalt und Gesamtgewicht des Inhalts wurde die Wassermenge im Lumen von Magen, Dünndarm und Dickdarm ausgerechnet. Nach der Entnahme des Magen-Darm-Trakts wurden Leber, Milz, Herz und Lunge entnommen, jeweils schnell gewogen, eine Probe oder das ganze Organ mit der Schere fein zerkleinert, die Probe wiederum gewogen und zur Wassergehaltsbestimmung getrocknet. Schließlich wurde als Probe der Muskulatur die ganze Muskulatur einer hinteren Extremität vom Beckengürtel bis zur Achillessehne sorgfältig vom Skelet abpräpariert, fein zerkleinert, gewogen und zur Trockengewichtsbestimmung bei 100—110° C zur Gewichtskonstanz getrocknet. Als Probe vom Skelet wurde der linke Femur mit der Knochenschere in sehr kleine Teilchen zerbrochen und gleichfalls das Trockengewicht bestimmt. Als Probe der Haut wurde ein

[1] Für die Überlassung von Versuchsmengen von Heparin danken wir den Firmen Hoffmann-La Roche, Grenzach/Baden, und NOVO, Kopenhagen, Vertretung C. H. Boehringer Sohn, Ingelheim/Rhein.

größerer, nicht enthaarter Hautlappen aus der linken Hüftgegend zerkleinert und getrocknet. — Zur Bestimmung des Natrium- und Kaliumgehalts wurden die getrockneten Organe oder Gewebe mit Mörsern zu einem feinen homogenen Pulver verrieben, das anschließend unter häufigem Umschütteln 48 Std lang mit 20 Teilen 0,75 n HNO_3 zu einem Teil Trockenpulver bei Zimmertemperatur extrahiert wurde. Der Natrium- und Kaliumgehalt wurde nach passender Verdünnung flammenphotometrisch bestimmt. (Flammenphotometer-Zusatzgerät zum Beckman-DU-Spektrophotometer.) Chloridbestimmungen in Gewebsextrakten mit verschiedenen argentimetrischen und merkurimetrischen Methoden führten zu stark streuenden und zum Teil widersprechenden Ergebnissen, über die an anderer Stelle berichtet werden soll.

In gleicher Weise wie die intakten Versuchstiere wurden 58 Ratten der gleichen Provenienz und Gruppen untersucht, bei denen 5—10 Tage vor dem Versuch eine — meist die linke — Niere in Äthernarkose entfernt worden war. Von diesen 58 Tieren wurden 15 ohne Wassergabe entblutet; die übrigen erhielten im 10 min-Abstand 10 + 8 ml Wasser; 13 von ihnen wurden 40 min, 13 60 min, 10 100 min und 7 140 min nach der ersten Wassergabe entblutet.

Mittelwerte und Standardabweichungen der Mittelwerte wurden nach konventionellen statistischen Methoden ausgerechnet. Alle Mittelwertsvergleiche wurden nach der Zweigruppen-Streuungszerlegung (Snedecor 1950) ausgeführt. Die Versuche wurden zwischen September und Dezember 1956 durchgeführt.

Tabelle 1. *Absolute Wassermengen (g/Ratte) in Magen, Dünndarm und Dickdarm vor und nach der Gabe von 10 + 8 ml H_2O mit der Magensonde*

	Magen		Dünndarm		Dickdarm	
	2 N	1 N	2 N	1 N	2 N	1 N
Kontrollen . . .	0,44 ± 0,06 (11)	0,56 ± 0,19 (10)	0,97 ± 0,12 (10)	0,79 ± 0,08 (10)	1,92 ± 0,33 (11)	1,53 ± 0,25 (10)
Nach „Wässerung“						
40 min	3,41 ± 0,36 (8)	1,93[2] ± 0,28 (8)	3,73 ± 0,37 (8)	3,48 ± 0,33 (8)	2,68 ± 0,34 (8)	2,18 ± 0,36 (8)
60 min	1,91 ± 0,33 (8)	1,40 ± 0,39 (7)	1,89 ± 0,34 (8)	1,89 ± 0,35 (8)	2,52 ± 0,53 (8)	2,50 ± 0,23 (8)
80 min	1,92 ± 0,44 (7)		1,46 ± 0,13 (7)		2,16 ± 0,29 (7)	
100 min	0,67 ± 0,09 (6)	1,22[1] ± 0,22 (7)	0,96 ± 0,09 (6)	1,24 ± 0,24 (7)	1,70 ± 0,11 (6)	2,38 ± 0,30 (7)
120 min	0,92 ± 0,20 (7)		0,77 ± 0,17 (7)		2,92 ± 0,26 (7)	
140 min	0,59 ± 0,16 (6)	0,58 ± 0,12 (6)	0,69 ± 0,12 (6)	0,67 ± 0,06 (6)	1,42 ± 0,29 (6)	1,38 ± 0,06 (6)

Alle Werte in g/Ratte; Mittelwerte $\bar{x} \pm s_{\bar{x}}$; Zahl der Bestimmungen in Klammern. 2 N = intakte Tiere; 1 N = einseitig nephrektomierte Tiere. Die Signifikanzen der Unterschiede der Mittelwerte zwischen intakten und einseitig nephrektomierten Tieren sind mit [1] = $P < 0{,}05$, [2] = $P < 0{,}01$ und [3] = $P < 0{,}001$ bezeichnet.

Ergebnisse

Die Wasserresorption aus dem Magen-Darm-Trakt erfolgt bei intakten und einseitig nephrektomierten Tieren mit der gleichen Geschwindigkeit.

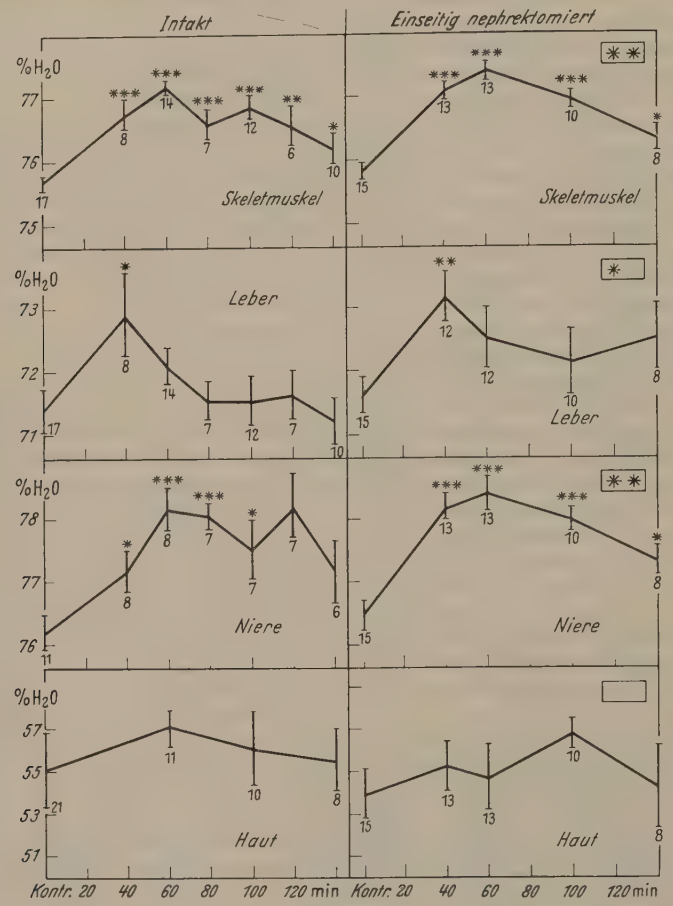


Abb. 1 a

Abb. 1 a u. b. *Wassergehalt verschiedener Gewebe und Organe intakter und einseitig nephrektomierter Ratten zu verschiedenen Zeitpunkten nach der Gabe von 10 + 8 ml dest. H_2O durch die Magensonde.* Alle Werte in Prozent Wasser im Feuchtgewicht. Angegeben sind Mittelwerte $\bar{x} \pm s_{\bar{x}}$. *Kontr.:* Wassergehalt der Gewebe bei gleich vorbehandelten Ratten, denen oral kein zusätzliches Wasser gegeben wurde. Mit * = $P < 0{,}05$, ** = $P < 0{,}01$, *** = $P < 0{,}001$ sind jeweils die Signifikanzen der Unterschiede der Mittelwerte gegenüber den nicht mit Wasser behandelten Tieren angegeben; oberhalb des Mittelwerts bei Zunahme gegenüber den Kontrollen, unterhalb des Mittelwertes bei Abnahme gegenüber den Kontrollen. Zu jedem Mittelwert ist die Zahl der Bestimmungen angegeben. Bei den einseitig nephrektomierten Ratten ist in einem rechteckigen Rahmen in der oberen rechten Ecke jeder einzelnen Kurve angegeben, ob bei Streuungszerlegung ein signifikanter Unterschied zwischen dem Wassergehalt der Gewebe oder Organe von einseitig nephrektomierten Tieren gegenüber intakten Ratten zu allen Zeiten vor und nach der Wassergabe nachgewiesen werden konnte: Ein leerer rechteckiger Rahmen bedeutet das Fehlen eines signifikanten Unterschiedes; beim Bestehen eines signifikanten Unterschiedes ist der Grad der Signifikanz mit * = $P < 0{,}05$, ** = $P < 0{,}01$, *** = $P < 0{,}001$ angezeigt

Von den mit der Magensonde gegebenen 18,0 ml Wasser sind im ganzen Magen-Darm-Trakt 40 min nach der ersten Wassergabe bei intakten Tieren noch 36,0 ± 8,8% (bei einseitig nephrektomierten 31,7 ± 7,7%)

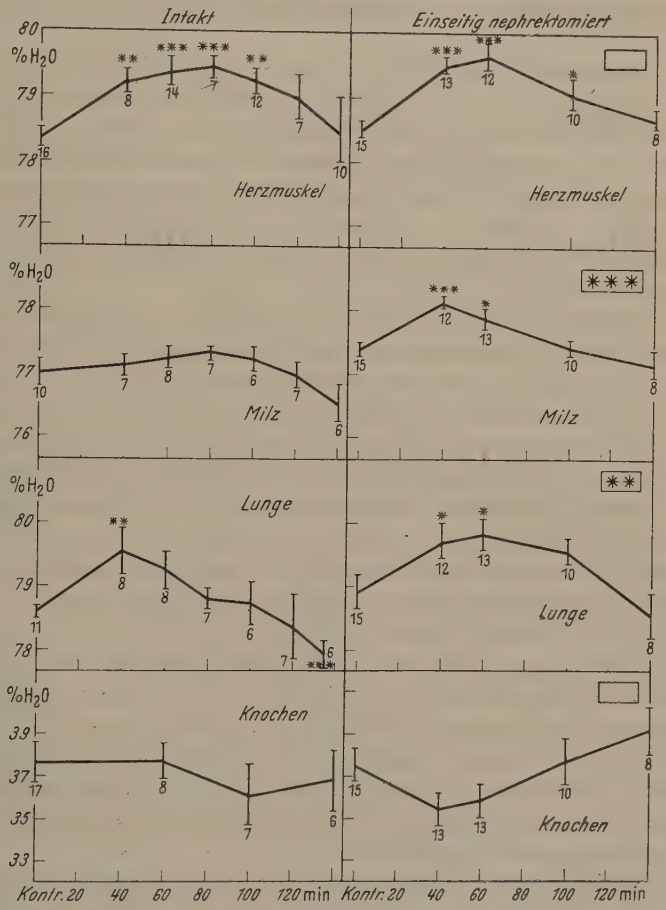


Abb. 1b

vorhanden, nach 60 min 16,6 ± 10,0% (16,2 ± 8,3%), nach 100 min 0 ± 4,4% (10,9 ± 7,1%), nach 140 min — 3,5 ± 6,0% (— 1,4 ± 4,2%). Über die Verteilung und Resorption des mit der Magensonde gegebenen Wassers in den einzelnen Abschnitten des Magen-Darm-Trakts unterrichtet Tab. 1. — Auch in dieser Beziehung bestehen zwischen intakten und einseitig nephrektomierten Tieren keine wesentlichen Unterschiede; es hat den Anschein, als ob bei den einseitig nephrektomierten Ratten die Magenentleerung zunächst etwas schneller und später etwas langsamer als bei den nicht operierten Tieren erfolgt. Das zusätzlich gegebene

Wasser scheint das Dickdarmlumen in keiner der beiden Gruppen zu erreichen.

Das resorbierte Wasser bewirkt zunächst einen signifikanten, aber anscheinend kurzdauernden Anstieg des Wassergehaltes der Leber (Abb. 1).

Der Wassergehalt der Leber liegt auf dem Höhepunkt der Steigerung — 40 min nach der ersten Wassergabe — bei einseitig nephrektomierten Ratten nicht höher als bei intakten Kontrolltieren. Wohl aber ergibt sich zu den verschiedenen Zeitpunkten nach der oralen Wassergabe ein signifikanter Unterschied zwischen einseitig nephrektomierten und intakten Versuchstieren (Abb. 1), der offensichtlich durch den langsameren Abfall des nach der Wässerung angestiegenen Wassergehalts der Leber bedingt ist.

Auch der Wassergehalt des Blutes ist 40 min nach der ersten Wassergabe gegenüber dem Ausgangswert bereits signifikant gesteigert (Abb. 2), erreicht sein Maximum aber erst um die 60. min nach der ersten Wassergabe — d. h. etwa zu dem Zeitpunkt, zu dem auch unter diesen Umständen meist die Maximaldiurese erreicht wird (Brunner, Kuschinsky u. Peters 1958). Der Zunahme des Wassergehaltes des Gesamtblutes entspricht eine Verdünnung des Hämoglobins (Abb. 2, linke Spalte) und des Plasma-Gesamtproteins. Dagegen läßt sich keine signifikante Verringerung des Hämatokritwertes nachweisen, so daß angenommen werden muß, daß Wasser auch in die Erythrocyten eingedrungen ist. In Tab. 2 sind diejenigen Wassermengen angegeben, die 60 min nach der ersten Wassergabe in 100 ml des ursprünglichen Vollbluts, bzw. Plasmas eingedrungen sein müssen, um den festgestellten Verdünnungsgrad der Trockensubstanz und des Hämoglobins im Blut bzw. des Gesamtproteins im Plasma zu erzielen. Die Wassermengen sind nicht signifikant voneinander unterschieden; eine verschiedene Verteilung des Wassers auf Plasma und Erythrocyten ließ sich somit unter den gewählten Versuchsbedingungen nicht nachweisen.

Bei einseitig nephrektomierten Ratten (Abb. 2, rechte Spalte) nimmt der Wassergehalt des Blutes bis zur 60. min nach der Wassergabe stärker zu als bei normalen Tieren. Der gleich großen Maximaldiurese (Brunner, Kuschinsky u. Peters 1958) entspricht hier eine stärkere Zunahme des Blutwassergehaltes: die Unterschiede sind signifikant ($P < 0{,}01$). Vor der Wassergabe und zu anderen Zeitpunkten nach der Wassergabe ist das nicht der Fall; wohl aber läßt sich bei Streuungszerlegung zeigen, daß der Wassergehalt des Blutes bei den einseitig nephrektomierten Tieren zu allen Zeiten vor und nach der Wassergabe hoch signifikant gegenüber den normalen Tieren gesteigert ist. Es darf daher wohl angenommen werden, daß bei einseitig nephrektomierten Ratten der Blutwassergehalt schon ohne die zusätzliche Wassergabe gegenüber normalen

Kontrolltieren leicht gesteigert ist und durch Wassergabe nicht nur stärker, sondern auch für längere Zeit zunimmt. Aus Tab. 2 ergibt sich, daß die bis zur 60. min nach der ersten Wassergabe ins Blut einströmende Wassermenge bei einseitig nephrektomierten Tieren nicht größer ist als

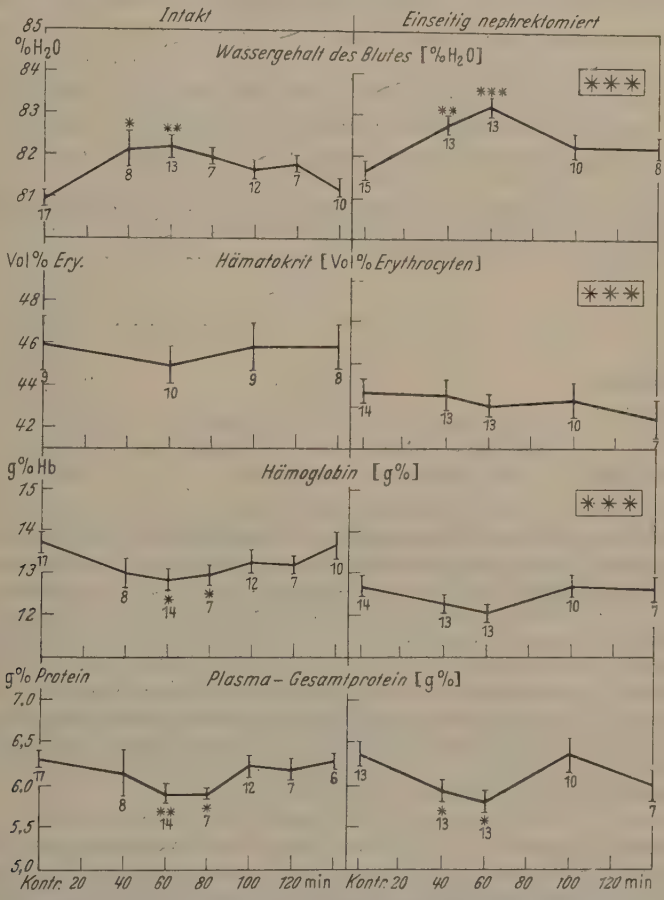


Abb. 2. Wassergehalt des Blutes, Hämatokritwert, Hämoglobingehalt des Blutes und Plasma-Gesamtprotein bei normalen und einseitig nephrektomierten Ratten vor und nach der Gabe von 10 + 8 ml H_2O per os: Zeichen und Bezeichnung wie in Abb. 1

bei intakten Tieren, die erreichten höheren Wasserspiegel also wohl auf einen schon vor der Wassergabe bestehenden höheren Wassergehalt des Blutes zurückzuführen sind. Der Hämoglobingehalt des Blutes bei einseitig nephrektomierten Ratten liegt bereits vor der „Wässerung" signifikant niedriger als bei normalen Tieren; eine signifikante Abnahme nach der Wassergabe läßt sich nicht nachweisen. Dem niedrigeren Hämoglobingehalt entspricht ein niedrigerer Hämatokritwert, der gleichfalls

nach der Wassergabe nicht weiter absinkt. Die Senkung des Hämatokritwertes und des Hämoglobingehaltes des Blutes bei einseitig nephrektomierten Ratten ist größer, als es der aus dem Wassergehalt errechneten Blutverdünnung (vor der Wassergabe) entsprechen würde. — Der Plasma-Eiweißgehalt bei einseitig nephrektomierten Ratten ist dagegen gegenüber den Kontrollen nicht signifikant verringert; die Abnahme des Plasma-Gesamtproteingehalts nach der Wassergabe ist nicht signifikant stärker als bei intakten Tieren, wobei die Möglichkeit offen bleibt, daß sich ein eventuell vorhandener Unterschied wegen der relativ großen Streuungen nicht nachweisen läßt (Abb. 2, rechte Spalte, und Tab. 2).

Tabelle 2. *Wasseraufnahme in Vollblut bzw. Plasma von normalen und einseitig nephrektomierten Ratten 60 min nach der Gabe von 10 + 8 ml H_2O per os*

	Normale Ratten	Einseitig nephrektomierte Ratten
Vollblut		
Trockensubstanz	6,8 ± 1,6	6,2 ± 1,3
Hämoglobin	7,5 ± 3,6	(5,1 ± 1,8)
Plasma		
Gesamtprotein	9,3 ± 3,1	9,3 ± 2,4

Die Werte geben die aufgenommene Wassermenge pro 100 ml Vollblut bzw. pro 100 ml Plasma an. Sie sind errechnet unter der Annahme, daß mit dem Wasser ins Blut weder Eiweiß noch Hämoglobin noch überhaupt Trockensubstanz in nennenswerten Mengen eindringt. Als Wassergehalt vor der Wassergabe ist der Mittelwert der Kontrollen angenommen. Eingeklammerte Werte bedeuten, daß sich ein signifikanter Konzentrationsunterschied zwischen Kontrollen und 60 min nach der ersten Wassergabe getöteten Tieren nicht nachweisen ließ, d. h. daß eine signifikante Verdünnung nicht eintrat. Die eingedrungenen Wassermengen sind berechnet als: Wasseraufnahme pro 100 ml ursprünglichen Blutes oder Plasmas = 100 × Mittelwert der Konzentration der Indicatorsubstanz (Trockensubstanz, Hämoglobin, Gesamtprotein) vor der Wassergabe: Mittelwert der Konzentration der Indicatorsubstanz 60 min nach Wassergabe ± s_x.

Elkinton, Danowski u. Winkler (1946) haben eine Reihe von Formeln aufgestellt, die gestatten, aus Veränderungen der Hämoglobin-Konzentration im Blut und des Hämatokritwertes Schlüsse auf Veränderungen des Gesamtblutvolumens, Erythrocytenvolumens und Plasmavolumens zu ziehen. Diese Formeln sind unter der Voraussetzung gültig, daß 1. während des Eintritts der beobachteten Veränderungen die Gesamterythrocytenzahl im strömenden Blut konstant geblieben ist, und 2. die untersuchte Blutprobe für das ganze zirkulierende Blut repräsentativ ist. Da die 2. Voraussetzung sicher, die 1. wahrscheinlich für unsere Versuchsbedingungen zutrifft, schien die Anwendung der Formeln für unsere Versuchsergebnisse gerechtfertigt.

Die Formeln für die Veränderungen sind:

1. Gesamtblutvolumen:

$$\frac{BV_2}{BV_1} = \frac{Hb_1}{Hb_2}$$

2. Volumen der Erythrocyten

$$\frac{EV_2}{EV_1} = \frac{Hkr_2}{Hkr_1} \cdot \frac{Hb_1}{Hb_2}$$

3. Plasmavolumen

$$\frac{PV_2}{PV_1} = \frac{1-Hkr_2}{1-Hkr_1} \cdot \frac{Hb_1}{Hb_2}$$

Hb = Hämoglobin in g-%; Hkr = Hämatokrit als Dezimalfraktion von 1,00.

Bei Zugrundelegung der Mittelwerte vor und 60 min nach der Wässerung ergeben sich die in Tab. 3 angegebenen Veränderungen.

Tabelle 3. *Veränderungen von Gesamtblutvolumen, Volumen der Erythrocyten und Plasmavolumen 60 min nach der oralen Gabe von 10 + 8 ml dest. Wassers*

	Normale Ratten %	Nach einseitiger Nephrektomie %
Gesamtblutvolumen	+ 6,9	+ 5,2
Volumen der Erythrocyten	+ 4,8	+ 3,8
Plasmavolumen	+ 8,0	+ 11,5

Berechnung der Veränderungen unter Zugrundelegung der Formeln von Elkinton, Danowski u. Winkler (1946) auf Grund der Mittelwerte der Kontrollgruppen und der 60 min nach der ersten Wassergabe getöteten Gruppe. Formeln siehe Text.

Die größere Zunahme des Blutwassergehalts während der Wasserdiurese bei einseitig nephrektomierten Ratten scheint demnach vor allem mit einer stärkeren Zunahme des Gesamtplasmavolumens gegenüber normalen Kontrolltieren einherzugehen.

Gleichzeitig mit dem Wassergehalt des Blutes nimmt der Wassergehalt des Skeletmuskels und des Herzmuskels zu, wobei der erhöhte Wassergehalt länger nachweisbar bleibt als die Hydrämie (Abb. 1, Tab. 4). Die Skeletmuskulatur nimmt nach einseitiger Nephrektomie insgesamt mehr Wasser auf und hält es länger als bei intakten Tieren (Abb. 1), obwohl die auf dem Höhepunkt der Wasseraufnahme eingetretene Wassermenge bei einseitig nephrektomierten und intakten Ratten nicht signifikant unterschieden ist (Tab. 4).

Der Herzmuskel enthält an sich sehr viel mehr Wasser als die untersuchte Skeletmuskulatur der Extremitäten. Die Zunahme des Wassergehalts während der Wasserdiurese ist nach einseitiger Nephrektomie nicht stärker als bei intakten Tieren.

Auch der Wassergehalt der Nieren nimmt gleichzeitig mit dem von Skeletmuskel und Blut zu und bleibt etwa ebenso lange erhöht wie derjenige des Skeletmuskels. Ein zeitliches Nachhinken der Zunahme des Wassergehalts der Nieren gegenüber der Hydrämie konnte somit nicht nachgewiesen werden. Auch der Zeitpunkt der maximalen Diurese fällt unter den gewählten Bedingungen (Brunner, Kuschinsky u. Peters 1958)

sowohl mit dem Zeitpunkt der maximalen Hydrämie als auch mit dem Zeitpunkt der größten Steigerung des Wassergehalts der Nieren zusammen. — Der Wassergehalt des Nierengewebes zu allen Zeiten nach einer Wassergabe ist bei einseitig nephrektomierten Ratten gegenüber normalen Tieren signifikant gesteigert (Abb. 1); auch hier ist aber die Wasseraufnahme je Gewichtseinheit Nierengewebe auf ihrem Höhepunkt bei den einseitig nephrektomierten Tieren nicht gegenüber normalen Tieren erhöht (Tab. 4).

Tabelle 4. *Zeitpunkt der größten Wasseraufnahme und Größe der Wasseraufnahme verschiedener Rattengewebe nach der oralen Gabe von 10 + 8 ml Wasser*

	Zeit nach 1. Wassergabe Minuten	Normale Ratten	Einseitig nephrektomierte Ratten
Skeletmuskel	60	$6{,}4 \pm 1{,}4$	$7{,}0 \pm 0{,}8$
Herzmuskel	60	$4{,}9 \pm 0{,}2$	$5{,}8 \pm 1{,}1$
Leber	40	$6{,}5 \pm 2{,}4$	$5{,}9 \pm 1{,}6$
Milz	40	∅	$2{,}2 \pm 0{,}7$
Lunge	40	$4{,}4 \pm 1{,}8$	$4{,}5 \pm 1{,}3$
Niere	60	$9{,}0 \pm 1{,}8$	$8{,}9 \pm 1{,}4$

Zeitangaben in Minuten nach der ersten Wassergabe. Wasseraufnahme in Milliliter Wasser pro 100 g ursprünglichen Gewebes. Mittelwerte $\bar{x} \pm s_{\bar{x}}$. Versuchszahlen wie in Abb. 1. Rechnung, Zeichen und Bezeichnungen wie in Tab. 2.

Für die Milz läßt sich bei normalen Tieren nach der oralen Wassergabe keine signifikante Zunahme des Wassergehalts nachweisen. Bei einseitig nephrektomierten Tieren nimmt der schon an sich höhere Wassergehalt der Milz nach der Wassergabe signifikant zu, wobei die Zunahme ihr Maximum, ähnlich wie bei der Leber, schon nach 40 min und somit vor dem Zeitpunkt der Maximaldiurese erreicht (Abb. 1).

Auch das Lungengewebe erreicht bei normalen Ratten bereits 40 min nach der ersten Wassergabe seinen höchsten Wassergehalt, der dann aber schnell wieder abfällt (Abb. 1). Nach 140 min kann der Wassergehalt des Lungengewebes gegenüber den Ausgangswerten sogar gesenkt sein. Nach einseitiger Nephrektomie liegt der Wassergehalt der Lunge nach oraler Wassergabe dagegen signifikant höher als bei normalen Tieren; seine Zu- und Abnahme erfolgt synchron mit dem Verlauf des Wassergehalts von Blut und Herzmuskel.

An Haut und Knochen lassen sich nach Wassergabe weder bei intakten noch bei einseitig nephrektomierten Ratten Veränderungen des Wassergehalts nachweisen. Der Wassergehalt der Haut sowohl „gewässerter" als auch nicht „gewässerter" Ratten schwankt außerordentlich stark, so daß der Nachweis von Veränderungen recht schwer sein dürfte.

Auch der Wassergehalt der Wände des Magens, des Dünndarms und des Dickdarms nimmt sowohl bei intakten als auch bei einseitig nephrektomierten Ratten nach der Wassergabe signifikant zu.

An Hand der gemessenen Harnvolumina, der in Tab. 4 zusammengestellten Werte der Wasseraufnahme verschiedener Organe und des ermittelten Wassergehalts der verschiedenen Anteile des Magen-Darm-Trakts (Tab. 1) lassen sich Bilanzen über den Verbleib der per os gegebenen 18,0 ml/Ratte Wasser zu verschiedenen Zeitpunkten nach der Wassergabe aufstellen. Eine genaue Berechnung der Bilanzen ist allerdings unmöglich und exakte Streuungsangaben daher sinnlos; In Tab. 5 sind nur die aus den Versuchsgruppen-Mittelwerten errechneten, von den verschiedenen Organen und Geweben aufgenommenen bzw. abgegebenen Wassermengen eingesetzt.

Tabelle 5. *Verteilung von per os gegebenen 18,0 ml/Ratte dest. Wassers auf Organe und Körpergewebe von Ratten 60 und 140 min nach der Wassergabe*

Zeit nach 1. Wassergabe	60 min	140 min
Harn	5,2	15,7
Mageninhalt	1,5	0,2
Magenwand	0,1 (0,2)	0 (0)
Dünndarminhalt	0,9	—0,3
Dünndarmwand	0,7 (0,6)	0 (0)
Dickdarminhalt	0,6	—0,8
Dickdarmwand	0,1 (0,1)	0,1 (0,3)
Blut	0,8	0,1
Leber	0,2 (0,5)	0 (0,1)
Milz	0 (0,2)	0 (0)
Skeletmuskulatur	4,6	1,6
Herzmuskel	0 (0)	0 (0)
Haut	1,3 (3,9)	0,4 (0,8)
Lunge	0 (0)	0 (0)
Niere	0,1 (0,1)	0,1 (0,1)
Skelet	0	—0,8
Insgesamt	16,1 (17,2)	16,3 (17,0)
Nicht wiedergefunden	1,9 (0,8)	1,7 (1,0)

Die angegebenen Mittelwerte (ml/Ratte) sind errechnet aus dem mittleren Gewicht der Organe der nicht gewässerten Versuchstiere und dem Mittelwert der Wasseraufnahme 60 bzw. 140 min nach der ersten Wassergabe (Abb. 1 und Tab. 4). Dabei wurde das Gewicht der Gesamtblutmenge zu 6,7% des Körpergewichts der Kontrolltiere, das Gesamtgewicht der Skeletmuskulatur zu 40% des Körpergewichts der Kontrolltiere und das Gewicht des Skelets zu 28% des mittleren Körpergewichts der Kontrolltiere eingesetzt. In Klammern sind die Differenzen zwischen dem Mittelwert des Gesamtgewichts eines Organs 60 bzw. 140 min nach der Wassergabe und dem Mittelwert des Gesamtgewichts des gleichen Organs vor der Wassergabe (Kontrolltiere) angegeben.

Während 60 min nach der ersten Wassergabe etwa gleich große Anteile im Harn ausgeschieden und in der Skeletmuskulatur gespeichert sind und sich die übrige Wassermenge ungefähr gleichmäßig auf die

verschiedenen Körpergewebe verteilt, ist nach 140 min fast die ganze gegebene Wassermenge ausgeschieden und allenfalls noch ein kleiner Rest in der Skeletmuskulatur übriggeblieben. Der extrarenale Wasserverlust scheint recht gering zu sein, da er wahrscheinlich nur einen Teil der nicht wiedergefundenen Wassermenge ausmacht.

Der Natriumgehalt des Plasmas fällt sowohl bei intakten als auch bei einseitig nephrektomierten Tieren in dem Maß ab, in dem Wasser ins Plasma aufgenommen wird (Abb. 3 und Tab. 6). Der Chloridgehalt des Plasmas beträgt vor der Wassergabe bei den intakten Ratten 9,25 ± 0,17 (17 Bestimmungen) mÄq% und bei einseitig nephrektomierten Ratten

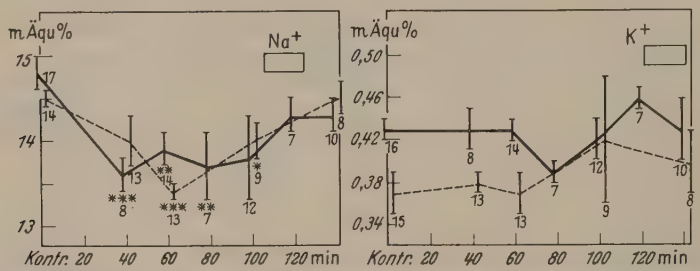


Abb. 3. Plasma-Natrium- und Kaliumspiegel intakter und einseitig nephrektomierter Ratten vor und zu verschiedenen Zeiten nach der oralen Gabe von 10 + 8 ml/Ratte dest. Wassers. Alle Angaben in mÄq/100 ml Plasma. Angegeben sind Mittelwerte $\bar{x} \pm s_{\bar{x}}$. Die durch ausgezogene Linien verbundenen Mittelwerte sind die von intakten Ratten; die durch gestrichelte Linien verbundenen Werte die von einseitig nephrektomierten Tieren, Versuchszahlen jeweils unter den Streuungsangaben. Bezeichnung der Signifikanzen der Unterschiede der Mittelwerte gegenüber dem Mittelwert der nicht „gewässerten" Gruppen wie in Abb. 1. Bezeichnung der Signifikanz des Unterschieds aller Werte von intakten Ratten gegenüber allen Werten von einseitig nephrektomierten Ratten wie in Abb. 1

10,31 ± 0,51 (9) mÄq-%. Er ist weder auf der Höhe der Hydrämie [bei intakten Ratten 8,78 ± 0,20 (14) und bei einseitig nephrektomierten Tieren 9,53 ± 0,32 (9)] noch zu irgendeinem anderen Zeitpunkt nach der Wassergabe gegenüber dem Ausgangswert signifikant gesenkt. Auch der Plasma-Kaliumspiegel (Abb. 3 und Tab. 6) nimmt auf der Höhe der Hydrämie und während des ganzen Verlaufs der Wasserdiurese nicht entsprechend der Wasseraufnahme des Blutes ab. Es muß daraus geschlossen werden, daß die nach einer großen oralen Wassergabe ins Plasma eindringende Flüssigkeit zwar äußerst natriumarm ist, aber nicht viel weniger Chlorid und Kalium enthält als das Plasma.

Auch im Skeletmuskel, im Herzmuskel, in der Leber und in der Niere kommt es nach der Wassergabe zu signifikanten Abnahmen des Natrium- und des Kaliumgehalts (Abb. 4). Trotz der unterschiedlichen Wasseraufnahme lassen sich signifikante Unterschiede im Verhalten der intakten und der einseitig nephrektomierten Ratten hier wegen der relativ großen Streuungen nur im Fall des Kaliumgehalts der Nieren im gesamten Beobachtungsmaterial nachweisen; außerdem liegt der Kaliumgehalt

des Herzmuskels nicht gewässerter einseitig nephrektomierter Ratten signifikant niedriger als bei normalen Tieren. Auch der Natriumgehalt des Lebergewebes ist 60 min nach der ersten Wassergabe bei einseitig nephrektomierten Ratten signifikant niedriger als bei intakten Tieren. —

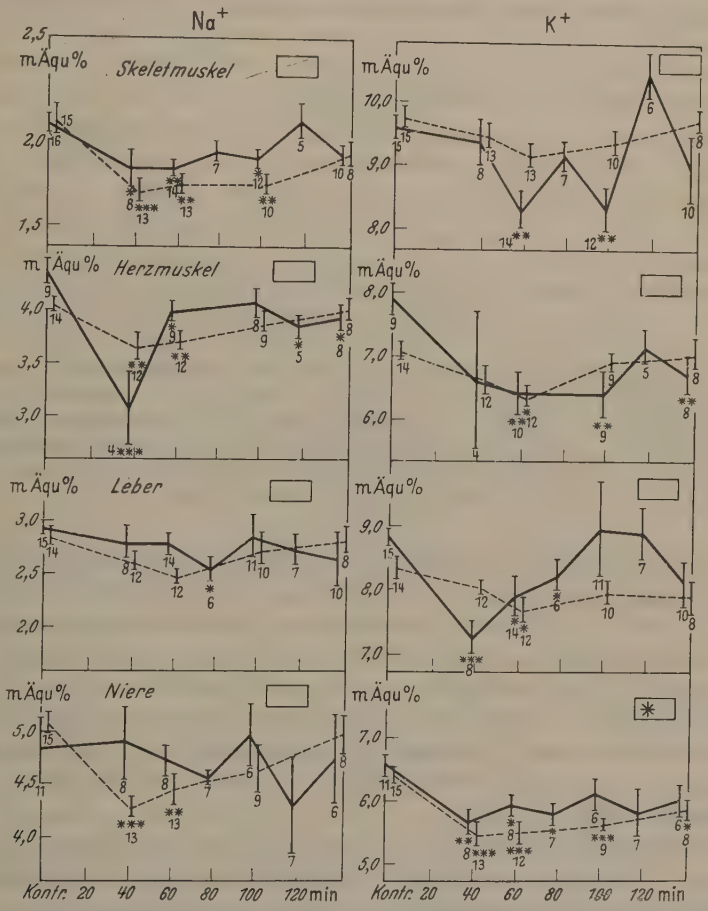


Abb. 4. Natrium- und Kaliumgehalt verschiedener Körpergewebe intakter und einseitig nephrektomierter Ratten zu verschiedenen Zeiten nach der oralen Gabe von 10 + 8 ml/Ratte dest. Wassers. Alle Werte sind in mÄq/100 g Frischgewicht (Feuchtgewicht) angegeben. Zeichen und Bezeichnungen wie in Abb. 3

Die Abnahme der Natrium- und Kaliumkonzentration je Gewichtseinheit Feuchtgewicht entspricht in den untersuchten Geweben im allgemeinen der Wasseraufnahme (Tab. 6).

In Tab. 6 ist für normale Ratten jeweils diejenige Natrium- und Kaliumkonzentration in den frischen Körpergeweben berechnet, die man auf Grund der Wasseraufnahme auf der Höhe der Hydrämie bzw. auf der

Höhe der Wasseraufnahme des untersuchten Gewebes erwarten müßte, wenn sich der Gesamtmineralbestand des untersuchten Gewebes nicht verändern würde. Aus der Tabelle ergibt sich, daß die Skeletmuskulatur auf der Höhe der Hydrämie anscheinend Natrium abgibt; eine signifikante Abgabe von Kalium ließ sich nicht nachweisen. Für die Herzmuskulatur

Tabelle 6. *Erwarteter und gefundener Natrium- und Kaliumgehalt verschiedener Körpergewebe von Ratten auf dem Höhepunkt der Hydrämie nach einer großen oralen Wassergabe*

	Zeit nach 1. Wassergabe Minuten	Natrium mÄq-%		Kalium mÄq-%	
		erwartet	gefunden	erwartet	gefunden
Plasma . .	60	13,84 ± 0,22	13,93 ± 0,18	0,40 ± 0,01	*0,43*[1] ± *0,01*
Skeletmuskel	60	1,98 ± 0,03	*1,83*[1] ± *0,05*	8,99 ± 0,10	8,31 ± 0,30
Herzmuskel .	60	4,14 ± 0,02	3,99 ± 0,10	7,53 ± 0,04	*6,43*[1] ± *0,34*
Leber	40	2,75 ± 0,06	2,80 ± 0,16	8,28 ± 0,18	*7,27*[1] ± *0,27*
Niere . . .	60	4,43 ± 0,06	4,74 ± 0,15	6,02 ± 0,10	5,94 ± 0,17

Alle Angaben in mÄq/100 g Frischgewebe. Die erwarteten Werte sind jeweils aus dem Mittelwert der nicht „gewässerten" Kontrollgruppe und den in Tab. 3 und Tab. 4 angegebenen Größen der Wasseraufnahme der verschiedenen Gewebe errechnet. Mit [1] sind diejenigen gefundenen Mineralkonzentrationen bezeichnet, die sich signifikant von den auf Grund der Wasseraufnahme erwarteten Werten unterscheiden. ($P < 0{,}05$). Versuchszahlen siehe Abb. 3 und Abb. 4.

läßt sich dagegen zum gleichen Zeitpunkt nach der Wassergabe eine Kaliumabgabe nachweisen. Lebergewebe gibt auf dem Höhepunkt seiner Wasseraufnahme Kalium ab, woraus sich vielleicht das Konstantbleiben des Plasma-Kaliumspiegels erklärt. Alle angeführten Veränderungen sind relativ schnell reversibel. — Bei einseitig nephrektomierten Ratten verändern sich die Natrium- und Kaliumkonzentrationen der Körpergewebe nach oralen Wassergaben in nahezu gleichem Ausmaß wie bei normalen Ratten; auf eine Wiedergabe der einzelnen Werte kann deshalb verzichtet werden.

Die Veränderungen der Natrium- und Kaliumkonzentrationen in der Magen-, Dünndarm- und Dickdarmwand entsprechen im wesentlichen der Größe der Wasseraufnahme und sollen deshalb nicht angeführt werden.

Diskussion

Die Wasserresorption aus dem Magen-Darm-Trakt der Ratte erfolgt sehr schnell. Da 30 min nach der Gabe von 18 ml Wasser (d. h. 40 min nach den ersten 10 ml) schon über 50% der gesamten gegebenen Menge aus dem Magen-Darm-Trakt verschwunden sind, muß die größte Resorptionsgeschwindigkeit vor diesem Zeitpunkt erreicht werden. Zwischen der maximalen Wasserresorption und der Maximalhydrämie, die mit der maximalen Diuresegeschwindigkeit zusammenfällt, besteht somit ein

Zeitabstand von etwa 30 min, der sich einerseits dadurch erklären dürfte, daß Wasser zunächst in der Leber aufgenommen wird und von dort erst, nachdem ein gewisser Sättigungsspiegel erreicht ist, an das Blut abgegeben wird. Andererseits scheint der Anstieg der Hydrämie dadurch verzögert zu werden, daß sich das ins Blut eingedrungene Wasser gleichzeitig auf die Skeletmuskulatur (und die Herzmuskulatur sowie das Nierengewebe) verteilt.

Der (nach den bei Umrechnung auf das Körpergewicht recht hoch erscheinenden Wassergaben in unseren Versuchen) je Zeiteinheit aus dem Magen und Dünndarm resorbierte Teil der gegebenen Gesamtmenge ist kaum kleiner als beim Menschen nach sehr viel kleineren Wassergaben (Lee, Code u. Scholer 1955).

Der Zeitpunkt des Eintritts der maximalen Hydrämie scheint bei der Ratte später zu liegen als beim Menschen bei einmaligen großen Wassergaben (Marx 1935); beim Menschen läßt sich eine Hydrämie bei „Wasserstoßversuchen" in der Regel nur innerhalb der ersten 15—30 min nach der „Wässerung" nachweisen — ein Umstand, der dazu geführt hat, daß manche Untersucher (Haldane u. Priestley 1915; Priestley 1915; Priestley 1921) das Auftreten einer Hydrämie nach einem Wasserstoß beim Menschen entweder ganz bestritten haben oder nur ganz geringfügige Zunahmen des Wassergehalts des Blutes fanden. Der Unterschied im Zeitpunkt des Auftretens der Maximalhydrämie zwischen Mensch und Ratte muß aber nicht unbedingt ein Artunterschied sein, sondern kann ebenso gut durch die verschiedene Größe der angewandten Wassergaben bedingt sein. Bei Hund und Kaninchen (Underhill u. Pack 1923; Bayliss u. Fee 1930; Smirk 1932; Heller u. Smirk 1932; Smirk 1933) scheint jedenfalls die Hydrämie zumindest ebenso lange nachweisbar zu bleiben wie bei der Ratte, wenn auch über den Zeitpunkt ihres Beginns und ihres Maximums keine Angaben vorliegen.

Auf der Höhe der Hydrämie bestehen in unseren Versuchen keine Unterschiede zwischen dem Grad der Blutverdünnung, der aus der Gesamttrockensubstanz oder dem Hämoglobingehalt des Bluts errechnet werden kann. Auch die Verdünnung der Gesamtplasmaeiweiße ist nicht signifikant größer, so daß eine Ungleichheit der Verteilung von Wasser auf Plasma und Erythrocyten nicht nachgewiesen werden kann. Von früheren Untersuchern (Bayliss u. Fee 1930; Smirk 1933) wurden wesentliche Unterschiede in der Blutverdünnung beschrieben, je nachdem, ob sie aus Veränderungen des Hämoglobingehalts des Gesamteiweißes oder aus anderen Indices berechnet wurde. Bei der recht großen Streuung dieser Werte sei dahingestellt, ob sich diese Unterschiede auch als statistisch signifikant erwiesen hätten.

Da nach großen Wassergaben die Gesamttrockensubstanz des Blutes, Hämoglobin, Plasmaeiweiß und Plasmanatrium die gleiche Verdünnung erfahren und andererseits der Hämatokritwert nicht abnimmt, muß gefolgert werden, daß sich das ins Blut eindringende Wasser annähernd gleichmäßig auf Plasma und Erythrocyten verteilt. Ein ähnliches Verhalten war schon von Smirk (1932) für Plasma und Erythrocyten von

nicht narkotisierten Kaninchen nach großen Wassergaben beschrieben worden.

Da eine gleiche Geschwindigkeit der Wasserdiurese bei intakten und bei einseitig nephrektomierten Ratten erreicht wird, nachdem die Hydrämie bei den einseitig nephrektomierten Tieren signifikant höher angestiegen ist als bei den normalen Vergleichstieren, scheint der Schluß erlaubt, daß die Wasserausscheidungsleistung der Nieren — d. h. die Wasserausscheidung je Gewichts- oder Volumeneinheit Nierengewebe — vom Grad der Hydrämie abhängig ist. Aus diesem Schluß folgt, daß die Größe der Wasserdiurese bei gleichbleibendem funktionstüchtigen Nierenparenchym durch den Grad der Hydrämie bedingt wird. Gegen diese Annahme sind von früheren Untersuchern eine Reihe von Einwänden erhoben worden.

Schon erwähnt worden ist, daß von manchen Untersuchern beim Menschen nach größeren oralen Wassergaben überhaupt keine Hydrämie gefunden werden konnte; es hat sich gezeigt (Marx 1935), daß in diesen Untersuchungen die Hydrämie zum falschen Zeitpunkt gesucht wurde. Auch bei *einzelnen* Ratten (Heller u. Smirk 1932) wurde trotz des Auftretens einer Wasserdiurese keine nachweisbare Hydrämie festgestellt, obwohl bei einer größeren Zahl von Ratten unter den gleichen Bedingungen nach der gleichen nicht besonders großen (50 ml/kg) Wassergabe eine leichte Hydrämie gefunden wurde. Auch dieser Einwand ist nicht stichhaltig, weil einerseits der Zeitpunkt der Maximalhydrämie von Ratte zu Ratte schwankt und deshalb bei der Untersuchung verpaßt worden sein kann, und weil andererseits wesentliche Unterschiede von Tier zu Tier im Ansprechen auf einen gleichen Grad von Hydrämie zu bestehen scheinen: jedenfalls sind die Streuungen der Werte für die Diuresegeschwindigkeiten immer größer als diejenigen der Blutverdünnungen. Das Bestehen eines zeitlichen Abstands vom Zeitpunkt der Maximalhydrämie bis zum Zeitpunkt der maximalen Wasserdiurese, der bei Hunden (Bayliss u. Fee 1930; Rioch 1930), Menschen (Smirk 1933), Kaninchen, Meerschweinchen und Ratten (Smirk 1932; Heller u. Smirk 1932) gefunden wurde, ist gleichfalls und wohl offensichtlich zu Unrecht als Argument gegen das Bestehen eines Zusammenhangs zwischen Hydrämie und Wasserdiurese angeführt worden. Schließlich wurde bei Kaninchen (Smirk 1932) gefunden, daß nach einer großen Wassergabe die innerhalb von 3 Std gemessene Diurese nicht dem Grad der Hydrämie 90 min nach der Wassergabe korreliert war, wobei sogar fast eine negative Korrelation zu bestehen schien. Daraus wurde geschlossen, daß nicht die Hydrämie die Diurese bedingt, sondern daß eine schlechte Wasserausscheidungsfähigkeit die Ursache einer ausgeprägten Hydrämie sein muß. Dieser Schluß erscheint nicht gerechtfertigt: eine Korrelation zwischen dem Grad der Hydrämie zu einem bestimmten Zeitpunkt nach einer Wassergabe und der insgesamt im Verlauf von mehreren Stunden ausgeschiedenen Wassermenge ist a priori nicht zu erwarten; sie könnte allenfalls zwischen der zu einem bestimmten Zeitpunkt gemessenen Hydrämie und der Größe der Diurese der unmittelbar vorangegangenen oder unmittelbar darauf folgenden Minuten bestehen.

Auch in unseren Versuchen ließ sich insgesamt weder bei den intakten noch bei den einseitig nephrektomierten Tieren eine Korrelation zwischen der von der Wassergabe bis zur Entblutung ausgeschiedenen Harnmenge und der dann gefundenen Hydrämie nachweisen, was nach dem Gesagten

wenig überrascht. Daß eine Herabsetzung der Wasserausscheidungsfähigkeit der Nieren zu einer Steigerung der Hydrämie führt, stimmt mit unseren Befunden und mit der Folgerung, daß die Größe einer Wasserausscheidung *je Einheit funktionstüchtigen* Nierengewebes vom Grad der Hydrämie abhängig ist, überein. Im gleichen Sinn spricht die Tatsache, daß in unseren Versuchen bei denjenigen 12 intakten oder einseitig nephrektomierten Versuchstieren, die nach einer Harnsammelperiode von 40 min (ab 2. Wassergabe) entblutet wurden, eine schwache ($r = 0{,}55$), aber signifikante ($P < 0{,}05$) Korrelation zwischen der Harnmenge je Gramm Nierengewebe und dem Wassergehalt des Blutes zur Zeit der Entblutung bestand. Bei größerem zeitlichen Abstand zwischen dem Beginn der Harnsammelperiode und der Entblutung wird die Korrelation zwischen der Diuresegeschwindigkeit im Augenblick der Blutentnahme und der gerade herrschenden Hydrämie verschleiert (siehe S. 34).

Der Schluß, daß der Wassergehalt des Blutes die Größe der Wasserdiurese bestimmt, sagt nichts darüber aus, ob dieser Effekt durch eine direkte Beeinflussung der Nieren oder auf dem Umweg über das supraoptico-hypophysäre System zustande kommt. Auch die Möglichkeit, daß die Größe der Wasseraufnahme anderer Organe, z. B. der Skeletmuskulatur oder aber auch der Lunge, einen Einfluß auf die Größe der Wasserdiurese hat, können wir nicht ausschließen.

Die Veränderung des Wassergehalts der Nieren nach einer Wassergabe zeigt in unseren Versuchen keinen zeitlichen Abstand gegenüber den Schwankungen der Hydrämie und des Wassergehalts der Skeletmuskulatur. Der Wassergehalt der Nieren dürfte in erster Linie durch die Menge der zum Zeitpunkt der Entnahme in den Tubuli vorhandenen Primär- und Endharnmengen bestimmt sein (Brunner, Kuschinsky, Peters u. Vorherr 1958). Der synchrone Verlauf der Kurven des Wassergehalts des Bluts und der Nieren spricht somit nicht für das Vorhandensein eines größeren zeitlichen Abstands zwischen Hydrämie und Wasserdiurese.

Wenn das Verteilungsvolumen von Chlorid als Maß der Extracellulärflüssigkeit im Organismus angesehen werden darf, spricht die Tatsache, daß auf der Höhe der Hydrämie und der Wasseraufnahme der Körpergewebe und Organe der Plasmachloridspiegel nicht abnimmt, gegen eine Zunahme des Extracellulärraums und somit für eine bevorzugte intracelluläre Aufnahme von Wasser in Organen und Geweben. Ein gleichzeitiges Eindringen von Natrium mit Wasser in die Körpergewebe läßt sich in unseren Versuchen nicht nachweisen (Tab. 6); die Skeletmuskulatur scheint sogar über den Verdünnungseffekt hinaus auf der Höhe ihrer Wasseraufnahme Natrium abzugeben. — Es erscheint möglich, daß zwischen der Konstanz des Plasmakaliumspiegels trotz der Hydrämie und dem reversiblen Kaliumverlust des Lebergewebes beim Wasserdurchgang ein Zusammenhang besteht.

Auffällig ist die Tatsache, daß die hier geschilderten Veränderungen des Natrium-Kaliumbestandes der verschiedenen Körpergewebe große Ähnlichkeit mit denjenigen Veränderungen zeigen, die bei der Ratte nach akutem Mineralentzug durch Injektion von Glucoselösung in die

Bauchhöhle auftreten (Woodbury 1956). Auch dann nehmen Skelettmuskel und Herzmuskel Wasser auf, wobei die Natrium- und Kaliumkonzentration abnimmt, während andererseits die Haut auch hier kein Wasser aufnimmt. Zum Unterschied von den Verhältnissen nach großen Wassergaben nimmt beim Mineralentzug allerdings auch der Knochen Wasser auf; der wesentlichste Unterschied ist aber der, daß beim Mineralentzug keine Hydrämie und keine Diuresesteigerung auftritt. Auch aus diesem Vergleich scheint zu folgen, daß der Wassergehalt des Blutes die Diurese bestimmt.

Da bei intakten und bei einseitig nephrektomierten Ratten die Wasserresorption aus dem Magen-Darm-Trakt mit gleicher Geschwindigkeit erfolgt und auf dem Umweg über *verschiedene Grade* der Hydrämie zu gleich schneller Diurese führt, muß der begrenzende Faktor für die Geschwindigkeit der Wasserdiurese nach einer akuten oralen Wassergabe die Geschwindigkeit der Wasserresorption aus dem Magen-Darm-Trakt sein. Die Steigerungen der Geschwindigkeit der Wasserdiurese unter diesen Bedingungen, die sich z. B. durch Training (Brunner, Kuschinsky u. Peters 1958) erzielen lassen, dürften somit als Folge einer Beschleunigung der Wasserresorption aus dem Magen-Darm-Trakt anzusehen sein. Außerdem muß an die Möglichkeit gedacht werden, daß physiologische oder pharmakologische Eingriffe die Geschwindigkeit der Wasserdiurese durch eine Beeinflussung der Nieren — etwa eine Senkung der Hydrämie-„Schwelle" der Nieren für das Einsetzen einer Wasserdiurese — senken könnten. Welche der beiden Möglichkeiten zutrifft, muß in jedem Einzelfall untersucht werden.

Summary

75 normal and 57 unilaterally nephrectomized rats were killed by exsanguination either before or at varying time intervals after an oral hydration with 18 ml of water per rat. The following estimations were made: The concentration of water, sodium and potassium in various organs and tissues; the water content of the stomach as well as of the small and large intestine; the concentration of water and hemoglobine in blood; the R.B.C. volume; the concentration of protein in plasma.

Hydration produced an increase in the *concentration* of water in blood and a corresponding decrease in blood hemoglobine and plasma protein concentration with a maximum at approximately 60 minutes after hydration. There was no change in R.B.C. volume at any time after hydration. The time of maximum hydraemia coincided with the time of maximal water diuresis. The increase in the *concentration* of water in blood was significantly larger in unilaterally nephrectomized than in normal animals. There was an increase in total blood volume as well as in plasma volume at the time of maximal diuresis.

Water absorption from the gut occured with equal velocity in normal and in unilaterally nephrectomized rats.

The water content of skeletal muscle, cardiac muscle and of the kidney increased at the same time as in the blood. The increase in tissue water of skeletal muscle and kidney, but not of cardiac muscle, was significantly greater in unilaterally nephrectomized than in normal rats. Before maximal hydraemia was reached, a transient increase in the concentration of water in liver tissue was observed. No change occured in the water content of the skin and of the bone.

At the height of hydraemia the sodium concentration in plasma was diminished correspondingly to the blood dilution, while the chloride and the potassium concentrations were unchanged. The fall in sodium and potassium concentrations of body tissues was generally related to the water uptake by these tissues. The potassium concentration in cardiac muscle and in liver as well as the sodium concentration in skeletal muscle decreased more than they would have by mere dilution.

All changes reverted to normal 120 to 140 minutes after hydration. The conclusion was reached that after acute oral hydration the rate of water diuresis per unit of functional kidney tissue depends on the degree of blood dilution. In unilaterally nephrectomized rats the degree of blood dilution increases, while the rates of diuresis and of water absorption from the gastrointestinal tract remain unchanged. The rate of water diuresis after single oral water doses therefore seems to be limited by the rate of water absorption from the gut.

Wir danken Fräulein R. Engel für eifrige und selbständige technische Mitarbeit bei den vorliegenden Untersuchungen.

Literatur

Bayliss, L. E., and A. R. Fee: Studies in water diuresis. Part IV. The changes in the concentration of electrolytes and colloids in the plasma of decerebrated dogs produced by the ingestion of water. J. of Physiol. **70**, 60 (1930).

Brunner, H., G. Kuschinsky, O. Münchow u. G. Peters: Der Tag-Nacht-Rhythmus der Diurese, Elektrolytausscheidung und Clearance des echten endogenen Kreatinins bei der Ratte. Arch. exper. Path. u. Pharmakol. **229**, 482 (1956).

Brunner, H., G. Kuschinsky u. G. Peters: Die Wasserdiurese und ihre Begrenzung nach ein- oder mehrmaliger oraler Gabe von Wasser bei der Ratte. Arch. exper. Path. u. Pharmakol. **233**, 1 (1958).

Brunner, H., G. Kuschinsky, G. Peters u. W. Vorherr: Veränderungen der Form, der Tubuli und des Wassergehalts der Nieren bei der Mannit- und Sulfatdiurese der Ratte. Arch. exper. Path. u. Pharmakol. **233**, 57 (1958).

Elkinton J. R., T. R. Danowski and A. W. Winkler: Hemodynamic changes in salt depletion and in dehydration. J. Clin. Invest. **25**, 120 (1946).

Haldane, J. S., and J. G. Priestley: The regulation of the excretion of water by the kidneys. I. J. of. Physiol. **50**, 296 (1915).

Heller, H., and F. H. Smirk: Studies concerning the alimentary absorption of water and tissue hydration in relation to diuresis. J. of Physiol. **76**, 1 (1932).

Lee, P. R., C. F. Code and J. F. Scholer: The influence of varying concentrations of sodium chloride on the rate of absorption of water from the stomach and small bowel in human beings. Gastroenterology **29**, 1008 (1955).

Marx, H.: Der Wasserhaushalt des gesunden und kranken Menschen. Berlin: Springer 1935. S. 64ff., S. 88ff.

Priestley, J. G.: The regulation of the excretion of water by the kidneys II. J. of Physiol. **50**, 304 (1915); **55**, 305 (1921).

Reinhold, J. G.: Total Protein, Albumin and Globulin, in M. Reiner Ed.: Standard Methods of Clinical Chemistry, Vol. 1, New York: Academic Press. 1953 S. 88.

Rioch, D. McK.: Water diuresis. J. of. Physiol. **70**, 45 (1930).

Smirk, F. H.: Changes in the blood composition of unanaesthetized rabbits following the ingestion of water and saline. With special reference to the distribution of fluid between plasma and corpuscles and the relationship between blood composition and diuresis. J. of Physiol. **75**, 81 (1932).

Smirk, F. H.: Effect of water drinking on blood composition in relation to diuresis. J. of Physiol. **78**, 127 (1933).

Snedecor, G. W.: Statistical Methods Applied to Experiments in Agriculture and Biology, 4. Auflage, The Iowa State College Press. Ames, Iowa. (1950).

Underhill, F. P., and G. T. Pack: The influence of various diuretics on the concentration of the blood. Amer. J. Physiol. **66**, 520 (1923).

Wong, S. Y.: Colorimetrie determination of iron and hemoglobin in blood II. J. of Biol. Chem. **77**, 409 (1928).

Woodbury, D. M.: Effect of acute hyponatremia on distribution of water and electrolytes in various tissues of the rat. Amer. J. Physiol. **185**, 281 (1956).

Prof. Dr. G. Kuschinsky, Pharmakolog. Inst d. Univ. Mainz

Arch. exper. Path. u. Pharmakol., Bd. 233, S. 39—56 (1958)

Aus dem Pharmakologischen Institut der Universität Mainz
(Direktor: Professor Dr. G. Kuschinsky)

Ausscheidung und Verteilung von Wasser und Mineralien nach oralen Gaben von physiologischer NaCl-Lösung bei der Ratte

Von
H. Brunner, G. Kuschinsky und G. Peters*

Mit 4 Textabbildungen

(Eingegangen am 29. Juli 1957)

Die orale Gabe von isotonischer NaCl-Lösung hat bei der Ratte (Brunner, Kuschinsky u. Peters 1956a) wie beim Menschen (Blomhert et al. 1951) eine geringere Diuresebeschleunigung zur Folge als die Gabe von Wasser; im Gegensatz dazu ist beim Hund (Chanutin, Smith u. Mendel 1924, Karvonen, Leppänen u. Pittkänen 1953) und bei der Maus (Brunner, Kuschinsky, Peters u. Stelter 1958) die Diuresesteigerung durch isotonische NaCl-Lösung ebenso groß oder größer als durch Wasser. Die Diurese nach der oralen Gabe größerer Mengen 0,9% NaCl-Lösung hat bei der Ratte wie beim Hund und der Maus den Charakter einer „isotonischen Salzdiurese" (Brunner, Kuschinsky u. Peters 1956a), während sie beim Menschen entweder die Form einer sehr schwachen Wasserdiurese oder (sukzessive) zunächst einer sehr schwachen Wasserdiurese und später die einer gleichfalls geringfügigen isotonischen Salzdiurese annimmt. — Bei der Ratte unterscheidet sich die Diurese nach isotonischer NaCl-Lösung von der Wasserdiurese nicht nur durch ihre absolute Geschwindigkeit, sondern auch durch ihre verschiedene Beeinflußbarkeit nach Eingriffen an Drüsen mit innerer Sekretion oder nach Behandlung mit Hormonen (Brunner, Kuschinsky u. Peters 1956b). Zur Erklärung des Unterschieds zwischen der Wasserdiurese einerseits und der Diurese nach isotonischer NaCl-Lösung andererseits soll in der vorliegenden Untersuchung zunächst die Diurese nach isotonischer NaCl-Lösung quantitativ näher charakterisiert werden. Weiterhin soll die Beeinflussung der Wasser- und Salzausscheidung nach isotonischer NaCl-Lösung durch Gewöhnung an die Zufuhr von Wasser oder von Salzlösungen und durch Nierenparenchymresektionen verschiedener Ausdehnung untersucht werden. Schließlich war zu klären, inwieweit sich

* Mit Unterstützung der Deutschen Forschungsgemeinschaft.

die Unterschiede zwischen der Wasserdiurese und der Diurese nach 0,9% NaCl-Lösung auf Verschiedenheiten der Wasser- und Salzverteilung in Blut und Körpergeweben zurückführen lassen.

Methodik

Die angewandten Methoden entsprachen in allen wesentlichen Punkten den in drei früheren Arbeiten (Brunner, Kuschinsky u. Peters 1956b, 1958a, 1958b) ausführlich dargestellten Versuchsanordnungen und -Auswertungen. Sie wichen nur in den folgenden Punkten von den früher geschilderten Untersuchungen ab:

1. Die Abhängigkeit der Diuresegeschwindigkeit von der Überschußwassermenge wurde nur nach einmaliger Gabe von 7 + 5 ml isotonischer NaCl-Lösung/Ratte (s. u.) untersucht. Hierzu wurden Versuche an 180 Ratten (92 ♂ und 88 ♀) ausgeführt.

2. In den Diureseversuchen wurde nicht wie bei der Wasserdiurese 10 + 8 ml/Ratte, sondern ausnahmslos nur 7 + 5 ml/Ratte isotonischer NaCl-Lösung in 10 min Abstand mit der starren Schlundsonde gegeben. Die Gabe von größeren Mengen isotonischer NaCl-Lösung hatte bei der Mehrzahl der Tiere wäßrige Diarrhoen zur Folge, die eine Messung der Wasser- und Salzausscheidung durch die Nieren unmöglich machten. Das Volumen der wäßrigen Diarrhoen nach der Gabe von 10 + 8 ml isotonischer NaCl-Lösung betrug 4—10 ml, d. h. ungefähr die Differenz der in den Wasser- und isotonischen NaCl-Versuchen per os gegebenen Flüssigkeitsmenge. Es war daher mit einer weiteren Steigerung der Diuresegeschwindigkeit durch größere Gaben von 0,9% NaCl-Lösung nicht zu rechnen. Die Gabe von 7 + 5 ml 0,9% NaCl-Lösung erwies sich außerdem als ausreichend, um für die ganze Versuchsdauer eine genügend große Überschußwassermenge zu gewährleisten (siehe Ergebnisse).

3. In den Versuchen über die Verteilung von Wasser, Natrium und Kalium in Blut und Körpergeweben erhielten 25 Ratten 10 + 8 ml 0,9% NaCl-Lösung per os, 17 Ratten 7 + 5 ml 0,9% NaCl-Lösung per os. Wie nach dem Gesagten zu erwarten war, unterschieden sich die nach diesen beiden Behandlungsarten gefundenen Werte des Wassergehalts und der Salzkonzentration in Blut und Organen nicht voneinander: sie werden daher in den Ergebnissen zusammen dargestellt. Eine getrennte Wiedergabe der Ergebnisse ist nur bei der Besprechung der Resorption aus dem Magen-Darm-Trakt erforderlich: hier werden nur die Werte nach der oralen Gabe von 10 + 8 ml 0,9% NaCl-Lösung angegeben, um die Werte mit den früher für die Resorption von Wasser aus dem Darm angegebenen (Brunner, Kuschinsky u. Peters 1958b) vergleichbar zu machen.

4. Die Abhängigkeit der Diuresegeschwindigkeit von der Menge des Überschußwassers bei progressiver Steigerung des Überschußwassers (vgl. Brunner, Kuschinsky u. Peters 1958a) wurde nicht bestimmt.

Die Versuchszahlen sind in den Abbildungen und Tabellen angegeben. Die Versuche wurden zwischen April 1954 und März 1957 durchgeführt.

Ergebnisse

Resorption aus dem Magen-Darm-Trakt

Nach der oralen Gabe von 10 + 8 ml 0,9% NaCl-Lösung wird insgesamt weniger Wasser resorbiert als nach der Gabe einer gleichen Menge Wasser (Tab. 1). Die Magen-Darm-Passage erscheint beschleunigt. 40, 60 und 80 min nach der ersten Wassergabe ist im Magen weniger Wasser vorhanden als nach Gabe von Wasser; von der 40. min nach der ersten

Wassergabe ab enthält der Dickdarm mehr Wasser als bei „ungewässerten" Kontrollen und dementsprechend mehr Wasser als bei Tieren, denen per os Wasser gegeben wurde (nach Wassergaben erfährt der Wassergehalt des Dickdarminhalts keine Zunahme). Von der 60. min nach der ersten Salzwassergabe ab setzen bei der Mehrzahl der Tiere Diarrhoen ein,

Tabelle 1. *Wassergehalt des Magen-, Dünndarm- und Dickdarminhalts zu verschiedenen Zeitpunkten nach der oralen Gabe von 10 + 8 ml 0,9% NaCl-Lösung bei Ratten*

	Magen	Dünndarm	Dickdarm
Kontrollen	0,50 ± 0,11 (9)	0,76 ± 0,19 (9)	1,46 ± 0,19 (9)
Nach 10 + 8 ml 0,9% NaCl:			
40 min	2,22*** ± 0,24 (6)	4,44 ± 0,37 (6)	4,63* ± 1,14 (6)
60 min	1,17* ± 0,27 (6)	3,18* ± 0,78 (6)	4,81* ± 1,25 (6)
80 min	0,88* ± 0,28 (5)	1,25 ± 0,27 (5)	5,07** ± 1,18 (5)
100 min	0,49 ± 0,11 (4)	1,09 ± 0,59 (4)	2,54 ± 0,33 (4)
140 min	0,55 ± 0,15 (4)	0,55 ± 0,05 (4)	2,28* ± 0,32 (4)

Alle Angaben in ml/Ratte; angegeben sind jeweils $\bar{x} \pm s_{\bar{x}}$; Versuchszahlen in Klammern. Mit * = $P < 0{,}05$, ** = $P < 0{,}01$ und *** = $P < 0{,}001$ sind die Signifikanzen der Unterschiede gegenüber Tieren bezeichnet, denen per os die gleiche Menge destillierten Wassers gegeben wurde (Brunner, Kuschinsky u. Peters 1958b, Tab. 1). Die signifikanten Unterschiede bezeichnen beim Mageninhalt kleinere, beim Dünndarm- und beim Dickdarminhalt größere Mittelwerte als nach der Gabe von Wasser.

Tabelle 2. *Verhältnis des echten Überschußwassers zum Gesamtüberschußwasser zu verschiedenen Zeitpunkten nach der oralen Gabe von 0,9% NaCl-Lösung*

	7 + 5 ml	10 + 8 ml 0,9% NaCl per os
40 min	52,0 ± 11,5 (4)	47,9 ± 4,6 (6)
60 min	64,6 ± 7,4 (4)	58,9 ± 9,5 (6)
80 min	84,6 ± 12,5 (3)	67,4 ± 8,0 (5)
100 min	86,9 ± 9,3 (2)	88,7 ± 7,1 (4)
140 min	96,5 ± 6,6 (4)	94,1 ± 4,0 (4)

Alle Angaben in Prozent (ml echtes Überschußwasser × 100/ml Überschußwasser); $\bar{x} \pm s_{\bar{x}}$.

die ein Absinken des absoluten Wassergehaltes des Dickdarminhalts zur Folge haben. Durch die beschleunigte Magen-Darm-Passage wird die insgesamt geringere Wasserresorption nach Gabe von isotonischer Salzlösung verschleiert: Im Dünndarm ist im Vergleich zu Tieren, denen Wasser gegeben wurde, nur 60 min nach der ersten Wässerung (d. h. auf dem Höhepunkt der Diurese) ein höherer Wassergehalt nachweisbar.

Wenn statt 10 + 8 ml 0,9% NaCl-Lösung nur 7 + 5 ml gegeben werden, kommt es nicht zu einer Vermehrung des Wassergehalts des Dickdarminhalts und nicht zur Diarrhoe. Die tatsächlich resorbierte

Wassermenge ist etwa gleich groß. Infolgedessen bestehen keine Unterschiede im Verhältnis des echten Überschußwassers zum Gesamtüberschußwasser zu verschiedenen Zeitpunkten nach der Gabe von 0,9% NaCl-Lösung zwischen Tieren, die 7 + 5 ml und solchen, die 10 + 8 ml 0,9% NaCl-Lösung erhalten haben (Tab. 2).

Die Abhängigkeit des Verhältnisses echtes Überschußwasser/Gesamtüberschußwasser von der Zeit nach der ersten Wassergabe (nicht vom Logarithmus der Zeit) läßt sich auch durch die Regressionsgleichung $\hat{Y} = 33{,}20 + 0{,}47\ X$ wiedergeben. In der Gleichung bedeutet $\hat{Y}$ = echtes Überschußwasser/Überschußwasser (in Prozent); X = Minuten nach der ersten Gabe von isotonischer NaCl-Lösung. Die Standardabweichungen zur angegebenen Regressionsgleichung betragen $s_a = 3{,}75$, $s_b = 0{,}07$.

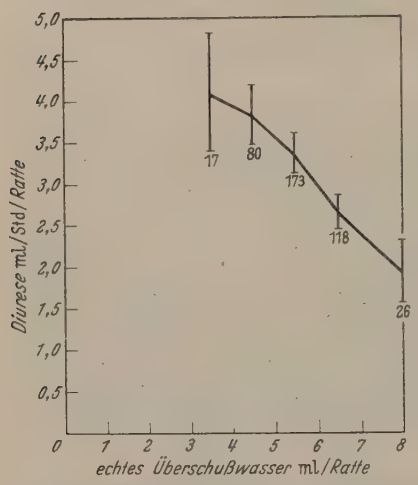


Abb. 1. *Abhängigkeit der Diuresegeschwindigkeit vom echten Überschußwasser nach der oralen Gabe von 12—18 ml 0,9% NaCl-Lösung.* Angegeben sind jeweils Mittelwerte $\bar{x} \pm s_{\bar{x}}$ für Klassen des echten Überschußwassers von 2,0—2,9 ml/Ratte, 3,0—3,9 ml/Ratte, 4,0—4,9 m/Ratte usw. Unter den Streuungsangaben Zahl der Bestimmungen in jeder Klasse

Überschußwasser und Diurese

Eine Abhängigkeit der Diuresegeschwindigkeit vom Überschußwasser läßt sich nach der Gabe von isotonischer NaCl-Lösung in den angegebenen Mengen nicht nachweisen. Der Korrelationskoeffizient zwischen der Diuresegeschwindigkeit und dem Gesamtüberschußwasser beträgt $r = 0{,}02$. Wenn die Diuresegeschwindigkeit auf die Menge des echten Überschußwassers bezogen wird, ergibt sich eine Abnahme bei echten Überschußwassermengen über 5—6 ml/Ratte (Abb. 1). Diese Abnahme läßt sich nicht als signifikante lineare Regression ausdrücken. — Die Gabe von 7 + 5 ml 0,9% NaCl-Lösung in den Versuchen zur Bestimmung der Maximaldiurese erscheint daher nicht nur zur Vermeidung von Diarrhoen erforderlich, sondern auch in den wenigen Fällen zweckmäßig, in denen keine Diarrhoen auftreten, weil bei größeren oralen Gaben zu hohe Werte des echten Überschußwassers erreicht würden.

Wasserausscheidung nach Gabe von 7 + 5 ml 0,9% NaCl-Lösung. Einfluß von Gewöhnung und Parenchymresektionen

Die maximale Diuresegeschwindigkeit nach 7 + 5 ml 0,9% NaCl-Lösung per os beträgt bei 180 Ratten *4,44 ± 0,14* ml/Ratte/Std. Insgesamt werden von der ersten Flüssigkeitsgabe ab unter diesen

Umständen in 150 min von 108 Ratten 7,19 ± 0,27 ml/Ratte Harn ausgeschieden. Die maximale Diuresegeschwindigkeit wird also nur über einen Teil der Gesamtharnsammelperiode aufrechterhalten. Sie liegt nach isotonischer NaCl-Lösung deutlich niedriger als nach oraler Gabe von

Tabelle 3. *Beeinflussung von Maximaldiurese und Gesamtwasserausscheidung nach 7 + 5 ml 0,9% NaCl-Lösung per os durch Gewöhnung*

	Maximaldiurese ml/Ratte/Std	Gesamtwasserausscheidung ml/Ratte/150 min
Vorversuch	4,63 ± 0,26 (14)	7,43 ± 0,54 (14)
Nach 10 Tagen zu 10,0 ml Flüssigkeit/Tag	5,68 ± 0,50 (16)	10,50*** ± 0,69 (16)
Nach weiter. 10 Tagen zu 18,0 ml Flüssigkeit/Tag	5,33 ± 0,33 (14)	9,75** ± 0,63 (14)

Angegeben sind Mittelwerte $\bar{x} \pm s_{\bar{x}}$. Durch ** = $P < 0{,}01$ und *** = $P < 0{,}001$ sind Signifikanzen der Unterschiede gegenüber dem Vorversuch bezeichnet. Fehlende * bedeuten, daß kein signifikanter Unterschied gegenüber dem Vorversuch bestand.

Tabelle 4. *Einfluß von Nierenparenchymresektionen auf Maximaldiuresegeschwindigkeit und Gesamtwasserausscheidung nach 7 + 5 ml 0,9% NaCl-Lösung per os*

	Maximaldiurese ml/Ratte/Std	Gesamtwasserausscheidung ml/Ratte/150 min
„Norm"	4,44 ± 0,14 (180)	7,19 ± 0,27 (108)
Vorversuch	3,86 ± 0,29 (30)	6,36 ± 0,54 (30)
Einseitige Nephrektomie:		
3. Tag	3,17 ± 0,28 (16)	5,40 ± 0,40 (16)
21. Tag	3,75 ± 0,21 (16)	7,21 ± 0,39 (16)
4/6-Resektion:		
3. Tag	3,37 ± 0,58 (6)	4,88 ± 0,98 (6)
21. Tag	3,49 ± 0,26 (5)	5,65 ± 0,89 (5)
5/6-Resektion:		
3. Tag	3,32 ± 0,81 (8)	4,32** ± 0,73 (8)
21. Tag	3,53 ± 0,61 (6)	5,81 ± 1,12 (6)

Angegeben sind jeweils Mittelwerte $\bar{x} \pm s_{\bar{x}}$. Die Signifikanzen der Unterschiede wurden untersucht gegenüber den Mittelwerten eines Vorversuchs, in dem die später parenchym-resezierte Tiergruppe untersucht worden war. Die Wasserausscheidung dieser Gruppe lag insgesamt niedriger als die Norm. Parenchymresektionen nach Brunner, Kuschinsky u. Peters (1956a, 1958a).

Wasser (8,72 ± 0,20 ml/Ratte/Std). Der Zeitpunkt der maximalen Diuresegeschwindigkeit liegt mit 45,7 ± 1,5 min nach der zweiten Wassergabe) (= 55,7 ± 1,5 min nach der ersten Wassergabe) wenig, aber signifikant früher als nach der Gabe von Wasser (53,6 ± 1,9 min nach der zweiten Wassergabe).

Zehntägige Behandlung mit täglich 10,0 ml Wasser oder 0,9% NaCl-Lösung per Magensonde hat keine signifikante Steigerung der Maximaldiurese nach isotonischer NaCl-Lösung zur Folge; auch nach weiteren 10 Tagen, in denen zusätzlich 10 + 8 ml Flüssigkeit pro Tag gegeben wurden, steigt sie nicht an (Tab. 3). Dagegen steigt die Gesamtharnausscheidung bei dieser Behandlung deutlich und signifikant an; d. h. die Dauer der maximalen Diuresegeschwindigkeit ist jetzt größer.

Die maximale Diuresegeschwindigkeit nach oraler Gabe von 0,9% NaCl-Lösung wird weder durch die Entfernung einer Niere noch durch die anschließende Resektion von $^1/_3$ oder $^2/_3$ des Parenchyms der übriggebliebenen Niere signifikant verringert. Auch die Gesamtwasserausscheidung innerhalb von 150 min wird durch diesen Eingriff nicht signifikant gesenkt; wohl aber sinkt sie signifikant nach der Resektion von $^2/_3$ der übriggebliebenen Niere; diese letztere Senkung ist innerhalb von 21 Tagen reversibel (Tab. 4).

Ausscheidung von Natrium, Kalium und Chlorid

Der zwischen der 20. und der 140. min nach der oralen Gabe von 7 + 5 ml 0,9% NaCl-Lösung (= 15,4 mÄq-% Na^+ und Cl′) ausgeschiedene Harn enthält bei 140 Ratten ($\bar{x} \pm s_{\bar{x}}$) 10,53 ± 0,32 mÄq-% Na^+; 3,21 ± 0,18 mÄq-% K^+ und 14,45 ± 0,33 mÄq-% Cl. Es besteht somit eine annähernd isotonische „Salzdiurese", wobei anstelle eines Teils des Natriums der gegebenen Flüssigkeit Kalium getreten ist. Die Ausscheidungsgeschwindigkeiten betragen bei den 140 Versuchen für Natrium 280 ± 13 µÄq/Ratte/Std; für Kalium 71 ± 3 µÄq/Ratte/Std und für Chlorid 360 ± 14 mÄq/Ratte/Std. Die Kaliumausscheidungen nach Gaben von isotonischer NaCl-Lösung liegen somit, wie früher beschrieben (Brunner, Kuschinsky u. Peters 1956 b), viel höher als bei der Wasserdiurese.

Die Gewöhnungsbehandlung mit 10 Tage lang fortgesetzten täglichen Gaben von 10,0 ml Wasser oder 0,9% NaCl-Lösung mit der Magensonde (zwischen der Wirkung der beiden Behandlungsarten besteht *kein* signifikanter Unterschied) führt innerhalb von 10 Tagen zu einer starken und hoch signifikanten Steigerung der Chlorid- und einer etwas geringeren Steigerung der Natrium-Konzentration und -Ausscheidung im Harn, wobei sich die Kaliumausscheidung nicht verändert. Nach weiteren 10 Tagen Behandlung mit 10 + 8 ml Flüssigkeit/Ratte/Tag bewirkt die Gabe von isotonischer NaCl-Lösung die Ausscheidung eines leicht hypertonischen Harns, in dem die Natrium-Konzentration die der gegebenen Flüssigkeit erreicht, die Kalium-Konzentration über 2,0 mÄq-% beträgt und die Chloridkonzentration höher als in der gegebenen Flüssigkeit liegt (Tab. 5).

Nach Nierenparenchymresektionen ist die Natrium- und Chloridausscheidungsfähigkeit nach Gabe von 0,9%iger Salzlösung stärker beeinträchtigt als die Wasserausscheidungsfähigkeit (Tab. 6). Schon die einseitige Nephrektomie führt zu einer geringen Abnahme der Natrium- und Chloridausscheidung im Harn; nach der Entfernung von $^1/_3$ oder von $^2/_3$ der übriggebliebenen hypertrophierten Niere nimmt die Natrium- und Chloridausscheidung im Harn zunächst wesentlich stärker als die Wasserausscheidung ab, so daß ein hypotonischer Harn produziert wird. Diese Störung ist relativ schnell reversibel. Am 21. Tag nach der Resektion unterscheiden sich die Natrium- und Chloridausscheidung im Harn nicht mehr signifikant von denen intakter Tiere. Die Kaliumausscheidung wird durch Nierenparenchymverluste am wenigsten beeinträchtigt und nimmt nach der Wiederherstellung einer normalen Natrium- und Chloridausscheidung jedesmal etwas überschießend zu (Tab. 6).

Wasserverteilung in Blut und Körpergeweben

Nach der oralen Gabe von 10 + 8 ml 0,9% NaCl-Lösung kommt es zu einer ebenso starken Hydrämie wie nach der Gabe einer gleichen Menge Wasser (Abb. 2 und Tab. 7). Der Höhepunkt der Blutverdünnung liegt jetzt aber — ebenso wie der Zeitpunkt der Maximaldiurese — etwas früher als nach der Gabe von Wasser. Im Gegensatz zu den Verhältnissen bei der Wasserdiurese dringt aber

Tabelle 5. *Natrium-, Kalium- und Chloridkonzentration und -ausscheidung im Harn vor und nach „Gewöhnung" bei Ratten bei Gabe von 0,9% NaCl-Lösung per os*

	Natrium		Kalium		Chlorid	
	Konzentration mÄq-%	Ausscheidung µÄq/R./Std	Konzentration mÄq-%	Ausscheidung µÄq/R./Std	Konzentration mÄq-%	Ausscheidung µÄq/R./Std
Vorversuch	11,8 ± 0,5 (14)	302 ± 19	2,5 ± 0,2 (14)	67 ± 5	12,9 ± 0,5 (14)	306 ± 22
Nach 10 Tagen zu 10 ml/Tag	13,8* ± 0,6 (16)	478*** ± 35	1,6* ± 0,2 (16)	53 ± 6	16,6*** ± 0,5 (16)	570*** ± 35
Nach weiter. 10 Tagen zu 18 ml/Tag	15,1*** ± 0,4 (14)	518*** ± 29	2,1 ± 0,2 (14)	71 ± 6	16,2*** ± 0,4 (14)	557*** ± 30

Konzentrationen in mÄq-%, Ausscheidungen in µÄq/Ratte/Std; Mittelwerte $\bar{x} \pm s_{\bar{x}}$, Versuchszahlen in Klammern. Zeichen und Bezeichnungen wie in Tab. 3.

Tabelle 6. *Natrium-, Kalium- und Cloridkonzentrationen und -ausscheidungen im Harn nach Nierenparenchymresektionen bei Gabe von 0,9% NaCl-Lösung per os*

	Natrium				Kalium				Chlorid			
	Konzentration mÄq-%		Ausscheidung µÄq/R./Std		Konzentration mÄq-%		Ausscheidung µÄq/R./Std		Konzentration mÄq-%		Ausscheidung µÄq/R./Std	
„Norm“	10,5	± 0,3 (140)	280	± 13	3,2	± 0,2 (140)	71	± 3	14,5	± 0,3 (140)	360	± 14
Vorversuch	10,9	± 0,8 (30)	325	± 32	2,3	± 0,3 (30)	65	± 10	14,6	± 0,6 (30)	425	± 35
Einseitige Nephrektomie												
3. Tag	8,4*	± 1,2 (16)	249	± 39	2,7	± 0,2 (16)	67	± 7	12,9*	± 0,7 (16)	309*	± 32
21. Tag	7,1**	± 0,5 (16)	230*	± 25	2,4	± 0,2 (16)	75	± 8	10,6**	± 0,8 (16)	340	± 38
4/6 Resektion												
3. Tag	8,1**	± 0,8 (6)	172*	± 43	2,2	± 0,3 (6)	42*	± 3	11,8*	± 1,0 (6)	252*	± 58
21. Tag	10,1	± 1,1 (5)	250	± 45	4,0*	± 0,3 (5)	95*	± 11	12,0*	± 1,1 (5)	305	± 60
5/6-Resektion												
3. Tag	6,1***	± 0,6 (8)	120***	± 25	2,2	± 0,3 (8)	40*	± 7	7,8***	± 1,0 (8)	153***	± 35
21. Tag	8,8	± 0,9 (7)	245	± 25	3,5	± 0,4 (7)	90*	± 12	10,8*	± 1,2 (7)	305	± 70

Zeichen und Bezeichnungen wie in Tab. 4 u. 5.

nach Gabe von isotonischer NaCl-Lösung das Wasser weder auf dem Höhepunkt der Hydrämie noch später in die Erythrocyten ein: Der Hämatokrit fällt im gleichen Maß wie der Hämoglobingehalt und die Gesamttrockensubstanz des Blutes (Tab. 7). Entsprechend der Verteilung des eingedrungenen Wassers im Plasma müßte mit einer wesentlich stärkeren Verdünnung des Plasmaeiweißes gerechnet werden, als

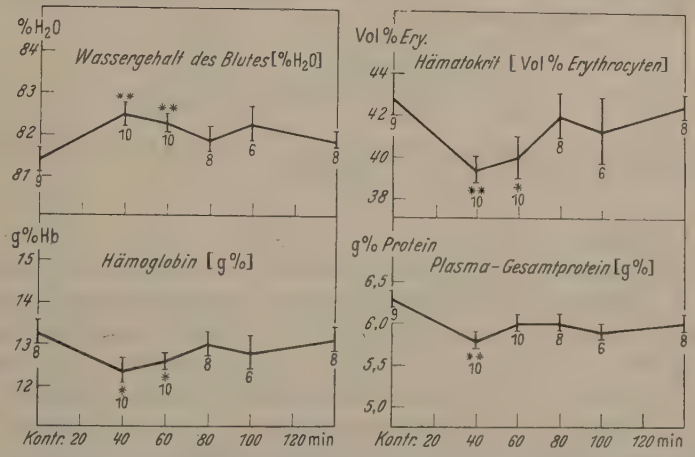


Abb. 2. *Wassergehalt des Blutes, Hämutokritwert, Hämoglobingehalt des Blutes und Plasma-Gesamtprotein vor und zu verschiedenen Zeitpunkten nach der Gabe von 10 + 8 ml 0,9% NaCl-Lösung/Ratte mit der Magensonde.* Angegeben sind jeweils Mittelwerte $\bar{x} \pm s_{\bar{x}}$. Signifikante Abweichungen vom Wert vor der Gabe von 0,9% NaCl-Lösung sind bei Anstieg des Wertes über, bei Sinken des Wertes unter der Kurve mit * = $P < 0{,}05$, ** = $P < 0{,}01$, *** = $P < 0{,}010$ bezeichnet. Die Versuchszahlen sind jeweils bei den Mittelwerten angegeben

Tabelle 7. *Wasseraufnahme pro 100 ml Blut bzw. Plasma auf der Höhe der Hydrämie (d. h. 40 min nach der ersten Flüssigkeitsgabe), nach Gabe von 10 + 8 ml 0,9% NaCl-Lösung bei Ratten*

Vollblut:	
Trockensubstanz	6,8 ± 1,7
Hämoglobin	7,4 ± 2,4
Plasma:	
Gesamtprotein	4,8 ± 2,2
Hämatokrit	9,3 ± 1,9

Angegeben sind die aus der Verdünnung verschiedener Blutbestandteile errechneten Blutverdünnungen im Mittelwert $\bar{x} \pm s_{\bar{x}}$, bezogen auf den jeweiligen Mittelwert der „ungewässerten" Kontrollgruppe. Die Versuchszahlen stimmen mit denen von Abb. 2 überein. Die Streuungen der Kontrollgruppe sind nicht in Betracht gezogen.

sie beobachtet wurde: Die Plasmaverdünnung, gemessen am Gesamteiweißgehalt, unterscheidet sich gerade signifikant ($P < 0{,}05$) von der aus dem Hämatokritenwert errechneten Plasmaverdünnung (Tab. 7).

Die Berechnung von Blut- und Plasmavolumen nach Elkinton, Danowski u. Winkler (1946) ergibt eine Zunahme des Gesamtblutvolumens von der gleichen Größenordnung wie nach der Gabe von Wasser, die aber ausschließlich auf eine Zunahme des Gesamtplasmavolumens ohne deutliche Veränderung des Erythrocytenvolumens zurückzuführen ist (vgl. Brunner, Kuschinsky u. Peters 1958b).

Tabelle 8. *Veränderungen von Gesamtblutvolumen, Erythrocytenvolumen und Plasmavolumen 40 min nach der Gabe von 10 + 8 ml 0,9% NaCl-Lösung mit der Magensonde, berechnet nach Elkinton, Danowski u. Winkler (1946)*

Gesamtblutvolumen	+ 5,8%
Volumen der Erythrocyten	— 1,6%
Plasmavolumen	+ 11,3%

Der Berechnung wurden nur die Mittelwerte der Abb. 2 zugrunde gelegt. Formeln vgl. Brunner, Kuschinsky u. Peters 1958b.

Ganz anders als nach der Gabe von Wasser verteilt sich nach der Gabe von isotonischer NaCl-Lösung das Wasser in den Körpergeweben (Abb. 3). Weder der Wassergehalt der Skeletmuskulatur oder der Herzmuskulatur noch der von Leber und Milz nehmen signifikant zu. Der Wassergehalt des Lungengewebes nimmt dagegen stärker zu als nach der Gabe von Wasser; der Unterschied ist bei statistischem Vergleich aller nach der Wässerung (mit Wasser oder mit 0,9% NaCl) gefundenen Werte deutlich signifikant ($P < 0{,}01$). Besonders auffällig ist die starke Zunahme des Wassergehalts der Haut, die weit über die Dauer der Diuresebeschleunigung hinaus persistiert.

Der Wassergehalt der Haut bei den Kontrolltieren der NaCl-Gruppe lag niedriger als bei den Kontrolltieren der Wassergruppe; es kann daher nicht ausgeschlossen werden, daß auch nach der Gabe von Wasser bei initial niedrigem Wassergehalt der Haut eine Zunahme erfolgen könnte.

Der Wassergehalt des Nierengewebes nimmt nach der Gabe von 0,9% NaCl-Lösung fast ebenso stark wie nach der Gabe von Wasser zu; die Zunahme des Wassergehalts persistiert ebenso lange.

Auch der Wassergehalt der Magen-, Dünndarm- und Dickdarmwand nimmt nach der Gabe von 0,9% NaCl-Lösung zu. Die Zunahmen sind etwa ebenso groß und dauern ebenso lang wie nach der Gabe von Wasser, auf die Wiedergabe der einzelnen Werte kann verzichtet werden.

Mineralien in Plasma und Geweben

Nach der oralen Gabe von isotonischer NaCl-Lösung ändert sich die Natriumkonzentration im Plasma nicht signifikant (Tab. 9); da der Wassergehalt des Blutes signifikant zunimmt, muß die aufgenommene Flüssigkeit etwa ebensoviel Natrium wie das ursprüngliche Plasma enthalten. Wenn die aufgenommene Flüssigkeit reines Wasser wäre, so wäre bei Annahme einer Aufnahme von etwa 7 ml Wasser/100 ml Blut

(Tab. 7) 40 min nach der ersten Gabe von Salzlösung eine Natriumkonzentration von 13,80 ± 0,23 mÄq-% Natrium zu erwarten (vgl. dagegen Tab. 9). — Eine signifikante Veränderung der Kaliumkonzentration im Plasma läßt sich gleichfalls nicht nachweisen. Allerdings sind die

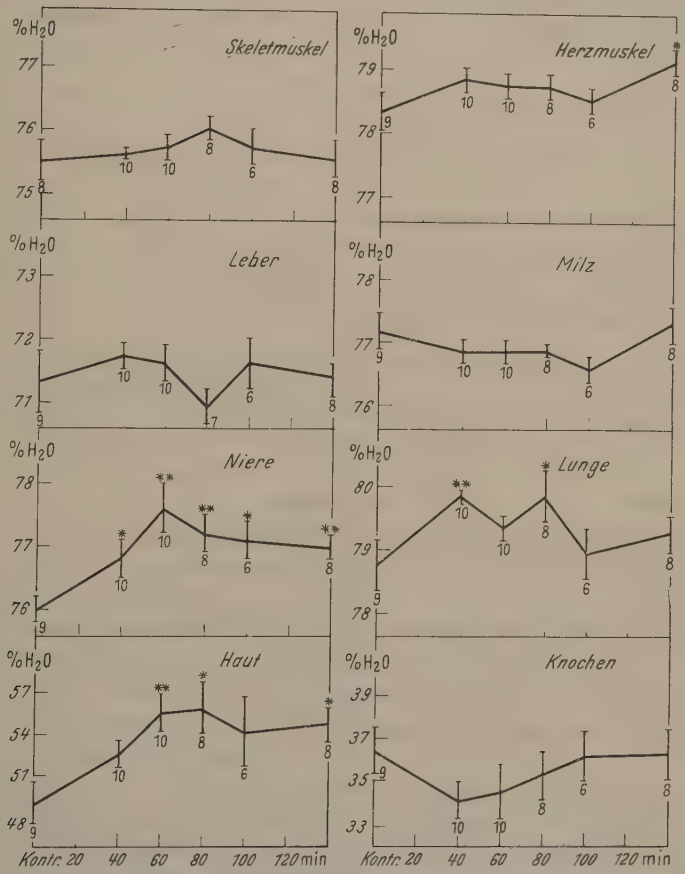


Abb. 3. *Wassergehalt verschiedener Körpergewebe zu verschiedenen Zeitpunkten nach der oralen Gabe von 10 + 8 ml 0,9% NaCl-Lösung mit der Magensonde.* Angegeben sind jeweils Mittelwerte $\bar{x} \pm s\bar{x}$. Bezeichnung der Signifikanzen wie in Abb. 2. Zeitangaben von der ersten Wassergabe ab

Streuungen von Tier zu Tier recht groß, so daß vielleicht eine geringfügige Abnahme verschleiert wird. — Die Chloridkonzentration im Plasma nimmt nach der oralen Gabe von isotonischer Salzlösung signifikant zu. Bei Aufnahme von reinem Wasser ins Blut wäre 40 min nach der Gabe der isotonischen Salzlösung eine Chloridkonzentration von 9,68 ± 0,07 mÄq-% zu erwarten (siehe Tab. 9). Die eindringende Flüssigkeit muß somit mehr Chlorid als das Plasma enthalten; die gefundenen Werte sind mit der

Annahme vereinbar, daß die ins Blut aufgenommene Flüssigkeit ebensoviel Chlorid wie die gegebene isotonische NaCl-Lösung, nämlich 15,38 mÄq% enthält.

Im Skeletmuskel und im Herzmuskel nimmt nach Wässerung mit 0,9% NaCl-Lösung der Natriumgehalt signifikant zu, obwohl eine

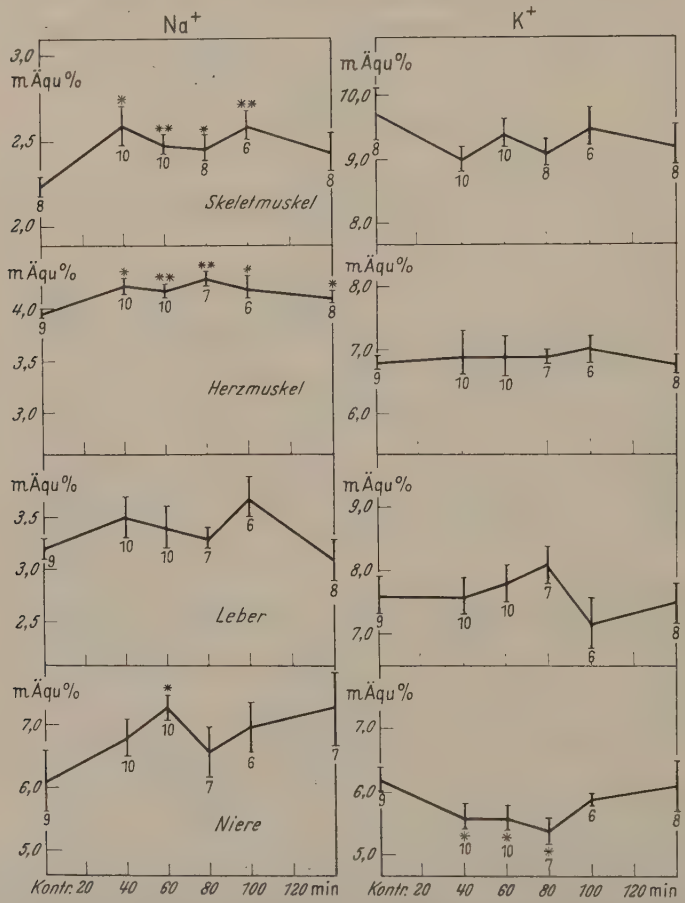


Abb. 4. *Natrium- und Kaliumkonzentration in verschiedenen Körpergeweben vor und zu verschiedenen Zeiten nach der oralen Gabe von 10 + 8 ml/Ratte 0,9% NaCl-Lösung.* Alle Angaben in mÄq/100 g frisches Gewebe (Feuchtgewebe). Angegeben sind jeweils Mittelwerte $\bar{x} \pm s_{\bar{x}}$. Bezeichnung der Signifikanzen der Unterschiede wie in Abb. 3. Angabe der Zeiten wie in Abb. 3

Wasseraufnahme nicht nachgewiesen werden kann. Im Skeletmuskel könnte der Natriumaufnahme möglicherweise eine Kaliumabgabe entsprechen, die sich aber wegen der großen Streuungen nicht sicher nachweisen läßt (Abb. 4). — Der Natrium- und der Kaliumgehalt des Lebergewebes verändert sich nicht signifikant. — In der Niere steigt der

BOSTON MEDICAL LIBRARY MAY 12 1961

Natriumgehalt des ganzen Gewebes signifikant an. Der Kaliumgehalt des Nierengewebes nimmt auf der Höhe der Diurese deutlich ab, erreicht aber nach 100—140 min wieder seinen Ausgangswert.

Tabelle 9. *Natrium-, Kalium- und Chloridkonzentration im Plasma vor und zu verschiedenen Zeitpunkten nach der oralen Gabe von 10 + 8 ml 0,9% NaCl-Lösung per os*

	Natrium mÄq-%	Kalium mÄq-%	Chlorid mÄq-%
Vor	14,76 ± 0,25 (8)	0,49 ± 0,04 (9)	10,35 ± 0,08 (9)
Nach 10 + 8 ml 0,9% NaCl p. o.			
40 min	14,48 ± 0,10 (8)	0,47 ± 0,02 (9)	10,77* ± 0,13 (10)
60 min	14,57 ± 0,12 (9)	0,43 ± 0,03 (9)	10,86** ± 0,11 (10)
80 min	14,59 ± 0,11 (6)	0,42 ± 0,01 (8)	10,90* ± 0,20 (8)
100 min	14,51 ± 0,07 (6)	0,44 ± 0,05 (6)	11,07** ± 0,22 (6)
140 min	14,46 ± 0,13 (6)	0,44 ± 0,06 (8)	10,90** ± 0,14 (8)

Alle Werte in mÄq-% (mÄq/100 ml Plasma). Bezeichnung der Signifikanzen der Unterschiede gegenüber den Werten vor der Gabe von 0,9% NaCl-Lösung mit * = $P < 0{,}05$, ** = $P < 0{,}01$. Versuchszahlen in Klammern. Zeitangaben von der ersten Wassergabe ab gerechnet. Angegeben sind Mittelwerte $\bar{x} \pm s_{\bar{x}}$.

Diskussion

Die geringere Resorptionsgeschwindigkeit von Wasser in der ersten Zeit nach der oralen Gabe von 0,9% NaCl-Lösung dürfte über eine Steigerung der Peristaltik die Ursache der beschleunigten Magen-Darm-Passage der gegebenen Flüssigkeit sein. Die Beschleunigung der Magen-Darm-Passage drückt sich bei Gaben von 18,0 ml/Ratte in Diarrhoen aus. Der Unterschied in der Resorptionsgeschwindigkeit für Wasser und 0,9% NaCl-Lösung dürfte sich nach kleineren Gaben von 0,9% NaCl-Lösung nicht nachweisen lassen.

Beim Menschen wurde gefunden (Lee, Code u. Scholer 1955), daß die Wasserresorption aus dem Darm nach Gabe von hypotonischen und isotonischen Salzlösungen gleich schnell erfolgt; es sei dahingestellt, ob der Unterschied gegenüber unseren Befunden auf einen Artunterschied zurückzuführen ist oder darauf beruht, daß beim Menschen relativ kleine Mengen isotonischer Salzlösungen gegeben wurden.

Trotz der gleich schnellen Resorption folgt übrigens beim Menschen auf die Gabe von isotonischer NaCl-Lösung per os eine wesentlich geringere Diurese als auf die Gabe von Wasser (Blomhert, Gerbrandy, Molhuysen, de Vries u. Borst 1951).

Die geringere Wasserresorption nach der Gabe von 0,9%iger NaCl-Lösung gibt indessen keine ausreichende Erklärung für die geringere Geschwindigkeit der Maximaldiurese im Vergleich zur Wasserdiurese. Die Hydrämie erreicht, wenn auch zu einem anderen Zeitpunkt, ebenso hohe Werte wie während der Wasserdiurese; auch nach der Gabe von

isotonischer NaCl-Lösung fallen der Zeitpunkt der maximalen Diuresegeschwindigkeit und der Zeitpunkt der maximalen Hydrämie zusammen. Für die geringere Diuresegeschwindigkeit bei gleicher Hydrämie könnte in erster Linie die Zunahme der Chloridkonzentration im Plasma und in zweiter Linie das Nichtabfallen der Natriumkonzentration im Plasma trotz bestehender Hydrämie verantwortlich sein. Dabei läßt sich auf Grund der vorliegenden Befunde nicht entscheiden, ob diese beiden Faktoren auf die Niere direkt oder auf dem Umweg über den Hypophysenhinterlappen wirken. Wir haben früher über Bobachtungen berichtet (Brunner, Kuschinsky u. Peters 1956 b), die gegen die letztere Annahme sprechen.

Andererseits ist es aber durchaus möglich, daß die unterschiedliche Geschwindigkeit der Wasserausscheidung nach Gabe von Wasser und von 0,9% NaCl-Lösung auf einem noch unklaren Weg durch die unterschiedliche Wasserverteilung im Organismus bedingt oder mitbedingt wird. Hierbei könnte die Tatsache, daß nach der Gabe von Wasser, nicht aber nach der Gabe von 0,9% NaCl-Lösung die Erythrocyten Wasser aufnehmen, eine Rolle spielen. Ebensogut könnte aber auch die Wasseraufnahme in die Muskulatur bei der Wasserdiurese die Nierenfunktion indirekt beeinflussen; nach der Gabe von isotonischer Salzlösung nimmt ja der Wassergehalt der Muskulatur nicht zu.

Der Befund, daß der Hämatokritwert bei der Wasserdiurese unverändert bleibt, nach der Gabe von isotonischer NaCl-Lösung aber wesentlich absinkt, war schon früher einmal beim Kaninchen erhoben worden (Smirk 1932). Beim Menschen wurde dagegen eine — wenn auch geringere — Abnahme des Hämotokritwerts auch bei der Wasserdiurese beobachtet — gleichgültig, ob die Wasserdiurese durch orale Wassergaben oder die intravenöse Zufuhr einer hypotonischen Glucose-Fructoselösung ausgelöst wurde (Hollander u. Williams 1957).

Die Berechnung der Veränderungen des Plasmavolumens und des Gesamtblutvolumens nach Elkinton, Danowski u. Winkler (1946) dürfte unter unseren Versuchsbedingungen berechtigt sein. Voraussetzungen dafür sind, daß 1. die untersuchte Blutprobe für das Gesamtblut repräsentativ ist, was bei der Ausblutung aus den Carotiden ohne weiteres anzunehmen ist, und daß 2. die Gesamtmenge der Erythrocyten im strömenden Blut sich nicht wesentlich verändert: daß diese Voraussetzung zutrifft, darf deshalb angenommen werden, weil bei der Ratte anscheinend keine größeren, schnell mobilisierbaren Blutspeicher bestehen (Davis, Bigelow u. Alpen 1955). Aus dieser Berechnung ergibt sich, daß die Gesamtblutmenge bei der Ratte nach der Gabe von Wasser und von isotonischer NaCl-Lösung im gleichen Ausmaß zunimmt. Die Tatsache, daß trotzdem recht unterschiedliche Diuresen auftreten, spricht nicht für eine direkte Abhängigkeit der Diuresegeschwindigkeit vom Blutvolumen durch Vermittlung von Dehnungsrezeptoren (Henry, Gauer u. Reeves 1956; Henry u. Pearce 1956; Zuidema, Clarke, Reeves, Gauer u. Henry 1956).

Die Geschwindigkeit der Diurese nach Gabe von 0,9% NaCl-Lösung läßt sich — vielleicht auf dem Umweg über eine Beschleunigung der Resorption aus dem Darm — durch Gewöhnung an orale Wassergaben

oder an orale Gaben von isotonischer NaCl-Lösung wesentlich steigern, ist aber auch am Ende eines derartigen Gewöhnungsversuchs noch erheblich langsamer als die Wasserdiurese nach einer entsprechenden Gewöhnung. Bei Dauertropfinfusionen in den Magen hatten im Gegensatz dazu Kellogg, Burack u. Isselbacher (1954) gefunden, daß sich die Diurese durch Gabe von 0,9% NaCl-Lösung stärker als durch Gabe von Wasser steigern ließ. — Auffällig ist, daß bei der Gewöhnung die renale Salzausscheidung stärker zunimmt als die Wasserausscheidung. Nach der Gewöhnung wird auf die Gabe von isotonischer NaCl-Lösung ein hypertonischer Harn ausgeschieden.

Da die maximale Diuresegeschwindigkeit nach der ein- oder mehrmaligen Gabe von isotonischer NaCl-Lösung durch Nierenparenchymresektionen nicht verringert wird, dürfte sie ebensowenig wie die maximale Geschwindigkeit der Wasserdiurese von der vorhandenen Menge funktionsfähigen Nierenparenchyms begrenzt werden; der begrenzende Faktor dürfte auch hier die Geschwindigkeit der Wasserresorption aus dem Darm sein. Andererseits scheint die Dauer der Diuresesteigerung nach der Gabe von isotonischer Kochsalzlösung von der Menge des vorhandenen Nierenparenchyms abhängig zu sein; denn die Gesamtausscheidungen innerhalb einer festgelegten Zeit werden durch Nierenparenchymresektionen herabgesetzt.

Die wesentliche *Steigerung* der Natrium- und Chloridausscheidung nach Gabe von isotonischer NaCl-Lösung gegenüber der Ausscheidung bei der Wasserdiurese kann sowohl auf die Steigerung der Chloridkonzentration im Plasma als auch auf das *Fehlen* der Senkung der Natriumkonzentration im Plasma zurückzuführen sei; beide Faktoren können entweder direkt renal oder indirekt wirken. Da nach Gabe von 0,9% NaCl-Lösung aber auch erheblich höhere Natrium- und Chloridkonzentrationen im Harn erreicht werden als im Durst (Brunner, Kuschinsky u. Peters 1956a), und da sich im Durst innerhalb von einigen Stunden weder die Natrium- noch die Chloridkonzentration des Plasma wesentlich ändert, dürfte die Steigerung der Salzkonzentration im Harn in erster Linie durch die Zunahme der Chloridkonzentration im Plasma bedingt sein.

Mit der Abnahme der Ausscheidung von Natrium und Chlorid im Harn trotz fehlender oder bei geringfügiger Beeinträchtigung der Wasserausscheidung nach Nierenparenchymresektionen ist die Ratte tatsächlich menschenähnlicher geworden (McCance u. Morrison 1956); ihr Konzentrationsvermögen für Natrium und Chlorid hat sich verringert, und die Gabe von 0,9% NaCl-Lösung führt nicht mehr zu isotonischer Salzdiurese, sondern zu einer bevorzugten Ausscheidung des gegebenen Wassers. Die Beeinträchtigung des Konzentrationsvermögens nach Parenchymverlust scheint aber unter diesen Bedingungen schnell reversibel zu sein.

Nach Gabe von isotonischer NaCl-Lösung wird bei Ratten zusammen mit Natrium und Chlorid eine beträchtliche Menge von Kalium ausgeschieden; wir hatten früher gezeigt (Brunner, Kuschinsky u. Peters 1956b), daß diese Steigerung der Kaliumausscheidung bei hypophysektomierten Tieren auch nach Substitution mit Nebennierenrindenhormonen ausbleibt. Die Steigerung der Kaliumausscheidung scheint also einerseits durch Vermittlung der Hypophyse zustande zu kommen; andererseits beruht sie nicht auf einer Zunahme des Kaliumplasmaspiegels (der eher leicht absinkt), sondern ist wahrscheinlich renal bedingt. Jedenfalls läßt die reversible Abnahme des Kaliumgehalts des Nierengewebes die Deutung zu, daß das zusätzliche ausgeschiedene Kalium zunächst aus dem Kaliumbestand des Nierengewebes „geborgt" wird, der sich dann anschließend aus dem Plasma wieder auffüllt.

Die Verteilung des Wassers im Unterhautbindegewebe und in bindegewebereichen Organen nach der Gabe von 0,9% NaCl-Lösung entspricht der Wasserverteilung bei Ödemen, die Wasserverteilung nach der Gabe von großen Wassermengen in den parenchymatösen Organen dagegen dem Typ der Wasservergiftung oder aber auch den Verhältnissen bei Salzentzug (Woodbury 1956).

Summary

Oral administration of 10 + 8 ml of 0.9 per cent saline per rat induces diarrhoea in most animals, the water loss from the bowel being approximately 6 ml per rat within two hours. Since equal volumes of pure water were readily absorbed from the gut, water absorption seems to be impaired when isotonic saline is administered. This impairment leads to a faster rate of passage of the given fluid through the gastro-intestinal tract.

When 10 + 8 and 7 + 5 ml of 0.9 per cent NaCl-solution were administered orally (with an interval of ten minutes), the ratio of the volume of water actually absorbed from the gut to the total water load increased at approximately the same speed. A regression equation relating this ratio to the time after hydration has been calculated. — The rate of diuresis after administration of 0.9 per cent saline solutions seems to be slightly diminished when more than 5—6 ml of fluid are actually absorbed from the gut.

The maximal rate of diuresis in rats given 7 + 5 ml of 0.9 per cent saline is much lower than that observed during water diuresis. Rats were trained by the daily administration of 10.0 ml of water or isotonic saline per day within ten days; they maintained the maximal rate of diuresis for a longer time and thus excreted more water within two and a half hours after receiving 7 + 5 ml of 0.9 per cent saline by stomach tube. The maximal rate of diuresis, though, was not increased by this kind of training.

Unilateral nephrectomy or excision of one third or two thirds of the remaining kidney did not depress the maximal rate of diuresis after oral administration of isotonic saline.

The diuresis following the oral administration of 0.9 per cent saline solution to rats is an „isotonic saline diuresis". While the concentration of chloride in urine is about equal to the concentration in the administered fluid, sodium is partially replaced by potassium. Administration of isotonic NaCl-solution thus leads to substantial potassium losses. — Rats were trained for ten days by daily oral administration of ten ml of water or isotonic saline and subsequent oral administration of 18 ml of the same fluids for another ten days; they excreted a slightly hypertonic urine when given isotonic NaCl-solution by stomach tube. This was due to an increase of the concentrations of sodium and chloride while the concentration of potassium remained the same as before training. — Unilateral nephrectomy as well as excisions of parts of the remaining kidney depressed the urinary excretion of sodium and chloride in rats given 0.9 per cent NaCl-solution.

The hydraemia as well as the increase in total blood volume in rats given 10 + 8 ml of 0.9 per cent NaCl-solution was comparable to that of animals given similar quantities of water. When the increase was brought about by 0,9 per cent NaCl-solution it was accompanied by a fall in hematocrit values, while in animals given water the supplementary water was distributed equally between plasma and red blood corpuscles. There was no increase in the water content of skeletal muscle, cardiac muscle, liver or spleen tissue after administration of 0.9 per cent NaCl-solution. On the other hand the water content of the lungs increased more than in animals given water, and there was a considerable increase in the water content of skin after administration of isotonic saline solution.

Administration of 0.9 per cent NaCl-solution (10 + 8 ml with ten minutes interval) dit not induce any significant change in the sodium or potassium concentrations of the plasma while a small but highly significant rise in the chloride concentration was observed. A transitory increase occurred in the sodium concentrations of skeletal muscle, cardiac muscle and kidneys. The potassium concentration of skeletal muscle, and the liver did not change significantly. The potassium concentration of kidney tissue decreased between the 40th and 80th minute after the oral administration of 10 + 8 ml 0.9 per cent saline and subsequently recovered to normal. The depletion of the renal potassium stores may be related to the urinary potassium losses induced by the oral administration of 0.9 per cent saline.

Für sorgfältige und kritische Mitarbeit bei den Versuchen und Bestimmungen dieser Arbeit danken wir Fräulein R. Engel.

Literatur

Blomhert, G., J. Gerbrandy, J. A. Molhuysen, L. A. de Vries and J. G. G. Borst: Diuretic effect of isotonic saline solution compared with that of water. Influence of diurnal rhythm. Lancet, **261**, 1011 (1951).

Brunner, H., G. Kuschinsky u. G. Peters: Die Wirkung von Vasopressin auf die renale Wasser- und Salzausscheidung der Ratte bei Veränderungen der Salzkonzentration des Trinkwassers und nach Nierenparenchymresektion. Arch. exper. Path. u. Pharmakol. **228**, 434 (1956a).

Brunner, H., G. Kuschinsky u. G. Peters: Die Beeinflussung der renalen Wasser- und Salzausscheidung normaler und hypophysektomierter Ratten durch Nebennierenrindenhormone. Arch. exper. Path. u. Pharmakol. **228**, 578 (1956b).

Brunner, H., G. Kuschinsky u. G. Peters: Die Wasserdiurese und ihre Begrenzung nach ein- oder mehrmaliger oraler Gabe von Wasser bei der Ratte. Arch. exper. Path. u. Pharmakol. **233**, 1 (1958a).

Brunner, H., G. Kuschinsky u. G. Peters: Die Verteilung von Wasser, Natrium und Kalium im Organismus der Ratte nach einer großen oralen Wassergabe. Arch. exper. Path. u. Pharmakol. **233**, 19 (1958b).

Brunner, H., G. Kuschinsky, G. Peters u. E. Stelter: Die Diurese der Maus nach oraler Gabe von Wasser oder von 0,9% NaCl-Lösung und ihre Beeinflussung durch Hypophysenhinterlappenhormone. (In Vorbereitung.)

Chanutin, A. A., H. W. Smith and L. B. Mendel: Saline diuresis in the dog. Amer. J. Physiol. **68**, 444 (1924).

Davis, W. M., J. D. Bigelow and E. L. Alpen: Changes in red cell volume and osmotic fragility of erythrocytes in the rat following acute blood losses. J. of Physiol. **178**, 17 (1955).

Elkinton, J. R., T. R. Danowski and A. W. Winkler: Hemodynamic changes in salt depletion and in dehydration. J. Clin. Invest. **25**, 120 (1946).

Henry, J. P., O. H. Gauer and J. L. Reeves: Evidence of the atrial location of receptors influencing urine flow. Circulation Res. **4**, 85 (1956).

Henry, J. P., and J. W. Pearce: The possible role of cardiac atrial stretch receptors in the induction of changes in urine flow. J. of Physiol. **131**, 572 (1956).

Hollander, W. jr., and T. F. Williams: A comparison of the water diuresis produced by oral and intravenous water loading in man. J. Labor. a. Clin. Med. **49**, 182 (1957).

Karvonen, M. J., V. Leppänen and M. E. Pittkänen: The effect of pituitrin, pitressin and pitocin on urinary sodium and potassium excretion in the dog. Ann. Med. exp. et Biol. Fenniae **31**, 117 (1953).

Kellogg, R. H., W. R. Burack and K. J. Isselbacher: Comparison of diuresis produced by isotonic saline solutions and by water in rats studied by a "steady state" method. Amer. J. Physiol. **177**, 27 (1954).

Lee, P. R., C. F. Code and J. F. Scholer: The inflence of varying concentrations of sodium chloride on the rate of absorption of water from the stomach and small bowel of human beings. Gastroenterology **29**, 1008 (1955).

McCance, R. A., and A. B. Morrison: The effects of equal and limited rations of water and of 1, 2, and 3 per cent sodium chloride on partially nephrectomized and normal rats. Quart. J. exper. Physiol. **41**, 365 (1956).

Smirk, F. H.: Changes in the blood composition of unanaesthetized rabbits following the ingestion of water and saline. With special reference to the distribution of fluid between plasma and corpuscles and to the relationship between blood composition and diuresis. J. of Physiol. **75**, 81 (1932).

Woodbury, D. M.: Effect of acute hyponatremia on distribution of water and electrolytes in various tissues of the rat. Amer. J. Physiol. **185**, 281 (1956).

Zuidema, G. D., N. P. Clarke, J. L. Reeves, O. H. Gauer and J. P. Henry: Influence of moderate changes in blood volume on urine flow. Amer. J. Physiol **186**, 89 (1956).

Prof. Dr. G. Kuschinsky, Pharmakolog. Inst. d. Univ. Mainz

Arch. exper. Path. u. Pharmakol., Bd. 233, S. 57—71 (1958)

Aus dem Pharmakologischen Institut der Universität Mainz
(Direktor: Prof. Dr. G. Kuschinsky)

Veränderungen der Form der Tubuli und des Wassergehalts der Nieren bei der Mannit- und Sulfatdiurese der Ratte

Von
H. Brunner, G. Kuschinsky, G. Peters und H. Vorherr* **

Mit 2 Textabbildungen

(Eingegangen am 29. Juli 1957)

Form und Dimensionen der Tubuli der Säugetierniere sollen nach allgemeiner Ansicht (Smith 1956) unter physiologischen Bedingungen recht wenig variabel sein; Veränderungen wurden meist als Folge von Erkrankungen oder von Anpassungsvorgängen an den Ausfall von einer großen Zahl von Nephronen (Oliver, Bloom u. MacDowell 1941; Oliver 1945, 1953; Platt, Roscoe u. Smith 1952) beschrieben. Diese Formveränderungen waren dann ebenso wie die manchmal bei schweren toxischen Nierenschädigungen schnell auftretenden morphologischen Alterationen meist irreversibel. Reversible kurzdauernde Schwankungen von Weite und Durchmesser der Nierentubuli wurden bisher nur selten beobachtet: So wurde z. B. (House, Nace u. Tassoni 1956) beim Goldhamster innerhalb der ersten 30 min nach der Gabe von diabetogenen Alloxandosen eine reversible starke Erweiterung aller Abschnitte der Nierentubuli bei gleichzeitiger deutlicher Blutfülle der Glomerula beschrieben. — Im Gegensatz zu dieser Ansicht von der relativen Konstanz der Morphologie des Nierenparenchyms innerhalb kurzer Beobachtungszeiten fielen nun aber bei der Durchsicht von fixierten Präparaten von Mäuse- und Rattennieren beträchtliche Unterschiede in der Weite der Lumina und in der Höhe der Epithelien sowohl der proximalen als auch der distalen Tubuli auf. Die Nierenpräparate waren zu Untersuchungen über den Blutgehalt verschiedener Abschnitte des Gefäßsystems in den Nieren fixiert und mit Benzidin gefärbt worden (Kuschinsky u. Vorherr); besonders weite Tubuli mit abgeflachten Epithelien wurden bei denjenigen Mäusen und Ratten gefunden, die 5—10 min vorher i.v. Injektionen von Mannit- oder Natriumsulfat erhalten hatten. — Zur Klärung dieses Befunds wurde

* Mit Unterstützung der Deutschen Forschungsgemeinschaft.

** Ein Teil der Ergebnisse der vorliegenden Untersuchung wurde von G. Peters und H. Vorherr auf der 23. Tagung der Deutschen Pharmakologischen Gesellschaft in Freiburg am 14. Juni 1957 in einem Vortrag mitgeteilt.

nun untersucht, wie verschiedene Substanzen, die eine osmotische Diurese auszulösen vermögen, nach i.v. Injektion Form und Weite der Tubuli beeinflussen; im Vergleich dazu wurde die Tubulusform bei der Wasserdiurese und bei der Diurese nach oraler Gabe von 0,9% NaCl-Lösung (Brunner, Kuschinsky u. Peters 1958a, 1958b) untersucht. Außerdem wurde jeweils auf der Höhe der Diurese der Wassergehalt des Nierengewebes bestimmt, um eventuelle Zusammenhänge zwischen Tubulusweite und Gesamtwassergehalt aufzudecken.

Methodik

Alle Versuche wurden vormittags zwischen 9 und 13 Uhr bei einer Temperatur von 28° C ± 2° an jungen weiblichen Ratten im Gewicht von 50—80 g durchgeführt, denen am Vorabend das Futter, nicht aber das Trinkwasser entzogen worden war. Zusätzlich stand den Versuchstieren in der Nacht vor dem Versuch neben Wasser 0,9% NaCl-Lösung ad libitum zur Verfügung. Bis zum Zeitpunkt des Versuchs waren die Tiere mit Gerstenkörnern ernährt worden.

In Vorversuchen wurde ermittelt, zu welchem Zeitpunkt nach der einmaligen i.v. Injektion verschiedener hypertonischer Lösungen die größte Diuresegeschwindigkeit erreicht wird. Die hypertonischen Lösungen wurden einheitlich in einer Dosierung von 0,5 ml/Ratte injiziert. Die injizierten, ungefähr 6fach hypertonischen Lösungen waren: 1. Mannit: 30%. — 2. Glucose: 30%. — 3. NaCl: 5,4%. — 4. $Na_2SO_4 \cdot 10\,H_2O$: 17,9%. Zum Vergleich wurden als isotonische Lösungen in den gleichen Mengen entweder 0,9% NaCl-Lösung oder 5% Glucoselösung injiziert: Zwischen beiden Lösungen ergab sich in der Wirkung kein Unterschied, so daß die Diuresen isotonischer Lösung zusammen angeführt werden. Gleich nach der Injektion wurden die Tiere in Diuresekäfige gesetzt und 60 min lang in 5 min-Abständen die Harnblase ausgedrückt. Die gemessenen Harnmengen wurden entsprechend dem vorher bestimmten Verdunstungsfaktor der Diuresekäfige korrigiert und in ml/Ratte/Std umgerechnet.

Zur Einleitung einer Wasserdiurese erhielten die Tiere mit der Magensonde im Abstand von 10 min 2mal 4,0 ml/Ratte destilliertes Wasser: Von der 20. min nach der zweiten Wassergabe ab wurde in früher beschriebener Weise (Brunner, Kuschinsky u. Peters 1958a) die ausgeschiedene Harnmenge in 10 min-Abständen gemessen. — 0,9% NaCl-Lösung wurde gleichfalls mit der Magensonde gegeben: Die Tiere erhielten zunächst 4,0 ml, dann 10 min später 2,0 ml/Ratte: Die Messungen der Diurese begannen gleichfalls 20 min nach der zweiten oralen Flüssigkeitsgabe.

Versuchsschema. Je 8 Tiere wurden nach Zufallskriterien einer der folgenden 8 Versuchsgruppen zugeteilt und auf dem erwarteten Höhepunkt der Diurese bzw. zu einer festgelegten Zeit getötet: 1. Kontrollgruppe: Die Tiere wurden 5 min nach i.v. Injektion von 0,5 ml 0,9% NaCl-Lösung getötet. — 2. Mannit-Gruppe: getötet 5 min nach der i.v. Injektion von 0,5 ml/Ratte 30% Mannit-Lösung. — 3. Sulfatgruppe: getötet 5 min nach i.v. Injektion von 0,5 ml/Ratte einer 17,9%igen Lösung von $Na_2SO_4 \cdot 10\,H_2O$. — 4. Hypertonische Glucose-Gruppe: getötet 5 min nach i.v. Injektion von 0,5 ml/Ratte 30% Glucoselösung. — 5. Hypertonische Kochsalz-Gruppe: getötet 10 min nach i.v. Injektion von 0,5 ml/Ratte 5,4% NaCl-Lösung. — 6. Durst-Gruppe: getötet nach einstündiger Flüssigkeitskarenz in Diuresekäfigen bei 28 ± 2° C. — 7. Wasserdiurese-Gruppe: getötet 40 min nach der zweimaligen Gabe von 4,0 ml/Ratte destilliertem Wasser mit der Magensonde. — 8. Isotonische NaCl-Gruppe: getötet 40 min nach der Gabe von 4 + 2 ml 0,9% NaCl-Lösung mit

der Magensonde im Abstand von 10 min. — Die Tiere wurden nach Betäubung durch Schlag auf den Kopf durch blitzschnelles Durchtrennen des Körpers mit einer scharfen Schere getötet; die Durchtrennung erfolgte zwischen Nierenlager und Zwerchfell. Die Nieren wurden schnell entnommen. Eine Niere wurde schnell gewogen, dann mit der Schere fein zerkleinert, wiederum gewogen und im Trockenschrank bei 120°C bis zur Gewichtskonstanz (gewöhnlich 72 Std lang) getrocknet und dann zur Bestimmung des Trockengewichts wiederum gewogen. Die andere Niere wurde in der Mitte auseinandergeschnitten, in Carnoyscher Lösung fixiert, entwässert und in Paraffin eingebettet. Von dem eingebetteten Gewebe wurden 8 μ dicke frontale und tangentiale Schnitte angefertigt und mit Hämatoxylin-Eosin gefärbt.

Messung und Auswertung. Von jeder untersuchten Niere wurde nach Zufallskriterien ein Frontalschnitt ausgewählt. Im ausgewählten Präparat wurden je 4 Rindenglomerula, 4 juxtamedulläre Glomerula, je 4 proximale Tubuli, 4 Henlesche Schleifen (pars tenuis), 4 distale Tubuli und 4 kleine Sammelröhren an der Markrindengrenze ausgemessen. Gemessen wurde bei den Tubuli jeweils der Gesamtdurchmesser, der Durchmesser des Lumens und die Wanddicke in zwei aufeinander senkrecht stehenden Richtungen, bei den Glomerula der Durchmesser des Kapselinnenraums und des Gefäßkonvoluts jeweils in der Richtung des größten Durchmessers und in der dazu senkrechten Richtung. Ausgemessen wurde von jedem der untersuchten Nephronenanteile jeweils der 3., 6., 9. und 12. Schnitt, der bei wahlloser Durchsicht des Präparats identifiziert werden konnte. Glomerula wurden nur dann mitgezählt, wenn Hilus oder Polkissen im Schnitt zu erkennen waren, Tubuli nur dann, wenn sie durch den Schnitt senkrecht zur Verlaufsrichtung getroffen erschienen. Aus den Messungen in den beiden senkrecht aufeinander stehenden Richtungen wurde jeweils ein Mittelwert gebildet, aus den 4 Mittelwerten eines Präparats wiederum ein Mittelwert für das ganze Präparat. Die Größen der Streuungen der Meßwerte innerhalb eines Präparats oder innerhalb einer untersuchten Niere wurden bei der statistischen Auswertung nicht in Betracht gezogen; bestimmt wurden vielmehr für jeden Nephronenanteil Mittelwerte und Streuungen zwischen den 8 Werten von den 8 Tieren einer Gruppe. — Alle Messungen wurden mit einem Okularmikrometer vorgenommen, das vorher gegen ein Objektmikrometer geeicht war. — Die Ausrechnung von Mittelwerten und Standardabweichungen der Mittelwerte ($s_{\bar{x}}$) sowie der Vergleich von Mittelwerten nach der Zweigruppen-Streuungszerlegung wurden nach konventionellen statistischen Methoden vorgenommen.

Ergebnisse

Die maximale Diuresegeschwindigkeit wurde nach der einmaligen i.v. Injektion von 6fach hypertonischer Mannit-, Sulfat- oder Glucoselösung innerhalb von 5 min erreicht; die Diuresegeschwindigkeit der zweiten 5 min war bereits wieder geringer. Nach der i.v. Injektion von 5,4% NaCl-Lösung wurde die größte Diuresegeschwindigkeit zwischen der 5. und der 10. min erreicht. — Nach oraler Gabe von Wasser in der angegebenen Menge wurde die größte Diuresegeschwindigkeit 40 min nach der zweiten oralen Wassergabe erreicht; das gleiche gilt für die Diurese nach oraler Gabe von 0,9% NaCl-Lösung. In Tab. 1 sind die erreichten maximalen Diuresegeschwindigkeiten angeführt und der Diuresegeschwindigkeit von Kontrollen während der ersten 5 min nach der i.v. Injektion von

0,5 ml/Ratte 0,9% NaCl-Lösung sowie der Diuresegeschwindigkeit von Ratten während einstündigen Durstes in den Diuresekäfigen gegenübergestellt.

Die erreichten Diuresegeschwindigkeiten unterschieden sich ausnahmslos signifikant von der Diurese der Kontrollen (0,9% NaCl i.v.) oder im

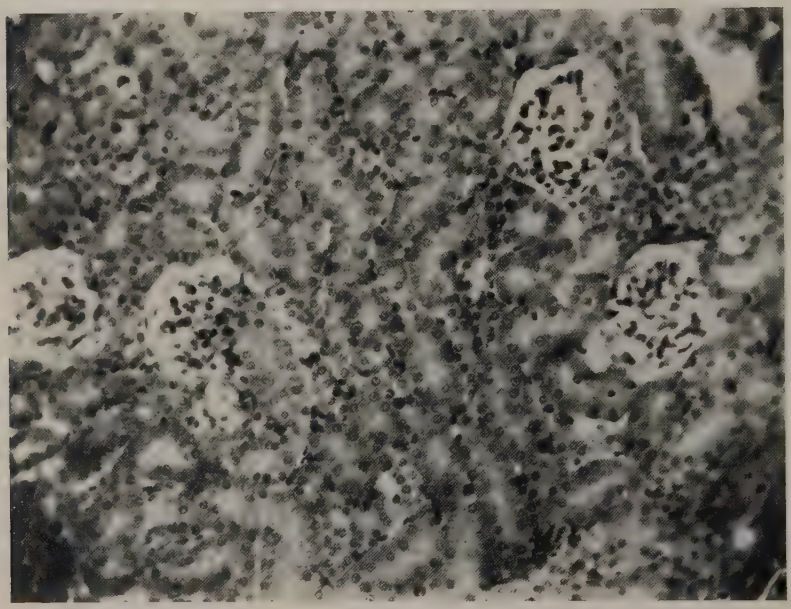


Abb. 1a

Abb. 1a—c. *Histologisches Bild der Rattenniere auf der Höhe der Wasserdiurese, der osmotischen Diurese nach i.v. Injektion von Mannit und bei Harnstauung.* Fixierung und Färbung s. Methodik. Schnittdicke 8 μ, Vergrößerung 235mal. — a Auf der Höhe der Wasserdiurese: normales Bild der Rattennierenrinde. Glomerula und Tubuli unverändert. Leichte Rundzelleninfiltration der Interstitien, die bei der Rattenniere physiologisch ist

Durst, unterschieden sich aber nicht signifikant voneinander. Nach oraler Flüssigkeitsgabe war die Diuresegeschwindigkeit auf 0,9% NaCl-Lösung geringer als auf die Gabe von Wasser.

Auf dem Höhepunkt der Diurese trat sowohl nach der Injektion von Mannit-, als auch von Sulfatlösung (Abb. 1b und 2, Tab. 2, 3 und 4) eine wesentliche Erweiterung sowohl der proximalen und distalen Tubulusabschnitte und der Henleschen Schleifen als auch des ganzen Sammelrohrsystems — insbesondere der kleinen Sammelröhrchen — auf. Das Bild ähnelte bei kleiner Vergrößerung dem histologischen Bild von Rattennieren 48—72 Std nach Unterbindung des Urethers. Das histologische Bild bei der Mannit- und Sulfatdiurese unterschied sich aber von dem der Harnstauungsniere bei näherer Betrachtung (Abb. 1c) in einigen

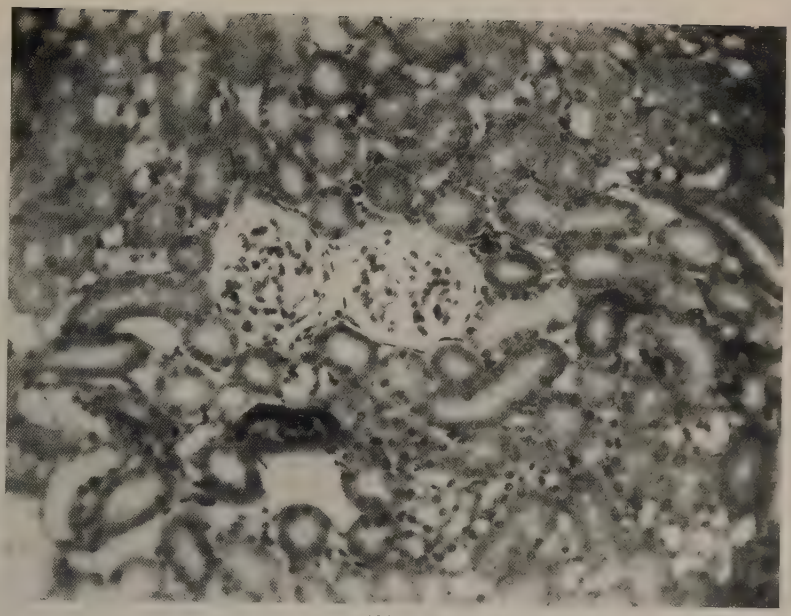


Abb. 1 b

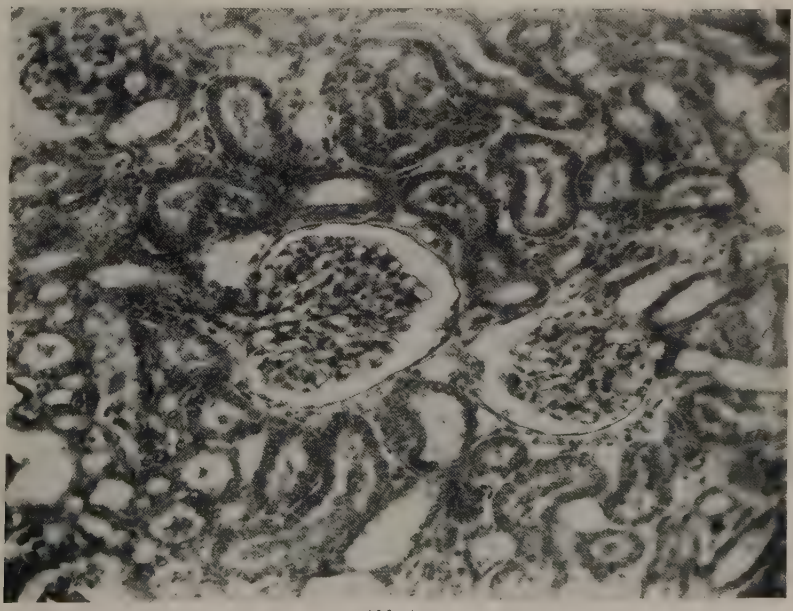


Abb. 1 c

Abb. 1 b u. c. b Auf der Höhe der Mannit-Diurese: starke Erweiterung und Ausdehnung der proximalen etwas geringere Erweiterung der distalen Tubuli und der Sammelröhren. Glomerula etwas blutarm; Kapselinnenräume nicht erweitert. — c 72 Std nach Ureterenligatur und kontralateraler Nephrektomie: extreme Erweiterung der distalen, etwas geringere Erweiterung der proximalen Tubuli, Erweiterung der Kapselinnenräume. Tubuli teils nekrotisch: vor allem in den proximalen Tubulusabschnitten nekrotische Epithelien. Glomerulumschlingen teils nekrotisch

wesentlichen Zügen: Während auf der Höhe der osmotischen Diurese die Glomerula unverändert sind, besteht bei Ureterenligatur eine starke Erweiterung des Kapselinnenraums mit Kernpyknose und kleinen

Tabelle 1. *Diurese auf der Höhe der Diuresebeschleunigung nach i.v. Injektion osmotischer Diuretica oder nach oraler Gabe von Wasser oder 0,9% NaCl-Lösung bei jungen Ratten*

	Diurese ml/Ratte/Std
Durst	0,84 ± 0,14 (8)
Wasser per os	6,10 ± 0,26 (8)
0,9% NaCl-Lösung per os	2,55 ± 0,57 (8)
0,9% NaCl i.v.	1,15 ± 0,47 (8)
30% Mannit i.v.	5,47 ± 0,98 (8)
17,9% $Na_2SO_4 \cdot 10\ H_2O$ i.v.	4,04 ± 0,65 (7)
5,4% NaCl i.v.	3,18 ± 0,55 (8)
30% Glucose i.v.	3,53 ± 1,00 (8)

Alle Werte in ml/Ratte/Std umgerechnet; angegeben sind $\bar{x} \pm s_x$; Versuchszahlen in Klammern. Die Werte sind für die Diurese nach i.v. Injektion von Mannit, Sulfat, Glucose und 0,9% NaCl aus der Diurese der ersten 5 min nach der Injektion, für die Diurese nach 5,4% NaCl aus der Harnausscheidung zwischen der 5. und 10. min nach der Injektion berechnet; die Diurese im Durst wurde aus der innerhalb von 1 Std vom Augenblick des Aussetzens der Flüssigkeitszufuhr ab ausgeschiedener Harnmenge ausgerechnet; für die Diurese nach oraler Gabe von Wasser und 0,9% NaCl-Lösung waren die zwischen der 20. und 40. min nach der zweiten Wassergabe ausgeschiedenen Harnmengen maßgebend.

Tabelle 2. *Durchmesser der Gefäßkonvolute und Kapselinnenräume von Rinden-Glomerula und juxtamedullären Glomerula bei Kontrolltieren, bei Durst und bei verschiedenen Diuresearten*

Behandlung	Rinden-Glomerula		Juxtamed. Glomerula	
	Gefäßschlingen	Kapselinnenr.	Gefäßschlingen	Kapselinnenr.
Durst	73,7 ± 2,0	77,4 ± 2,1	80,0 ± 2,0	83,3 ± 2,0
Wasser per os	72,6 ± 2,1	77,9 ± 2,3	79,9 ± 3,0	82,7 ± 3,0
0,9% NaCl per os	75,5 ± 1,6	78,9 ± 1,8	77,3 ± 1,8	80,2 ± 1,8
0,9% NaCl i.v.	77,4 ± 2,1	80,9 ± 2,1	80,5 ± 2,1	85,8 ± 2,1
30% Mannit i.v.	76,4 ± 2,5	82,5 ± 2,8	82,8 ± 2,6	89,7 ± 2,6
17,9% $Na_2SO_4 \cdot 10\ H_2O$ i.v.	79,1 ± 2,6	81,2 ± 2,3	83,5 ± 2,8	88,4 ± 2,3
5,4% NaCl i.v.	76,1 ± 2,3	79,7 ± 2,1	77,9 ± 2,5	81,8 ± 2,6
30% Glucose i.v.	73,3 ± 2,1	76,9 ± 2,1	78,7 ± 2,3	83,3 ± 2,8

Alle Angaben in μ; angegeben sind jeweils Mittelwerte $\bar{x} \pm s_{\bar{x}}$ von 8 Tieren. Keine signifikanten Unterschiede.

umschriebenen Nekrosen des Gefäßkonvoluts. Bei der Mannit- und Sulfatdiurese sind zwar die distalen Tubuli weiter als die proximalen; gegenüber normalen Kontrollen ist aber die Erweiterung der Lumina bei den proximalen Tubuli auffälliger als bei den distalen (Abb. 1b). Bei der

Tabelle 3. *Dimensionen von proximalen Tubuli und dünnen Teilen der Henleschen Schleifen bei Kontrollen (0,9% NaCl i.v.), Durst und verschiedenen Diuresearten*

Behandlung	Proximale Tubuli				Henlesche Schleifen (pars tenuis)		
	Durchmesser	Lumen	Wandstärke	0	Durchmesser	Lumen	Wandstärke
Durst	35,8 ± 1,2	3,8 ± 0,2	16,0 ± 0,5	1005 ± 66	18,0 ± 0,8	6,7 ± 0,7	5,6 ± 0,3
Wasser p. o.	38,1 ± 0,8	5,1 ± 0,3	16,7 ± 0,3	1137 ± 48	$20{,}5^{*} \pm 0{,}8$	8,0 ± 0,5	6,2 ± 0,3
0,9% NaCl p.o.	37,2 ± 1,0	4,8 ± 0,5	16,2 ± 0,5	1062 ± 55	19,0 ± 0,5	7,5 ± 0,5	5,7 ± 0,2
0,9% NaCl i.v.	37,5 ± 0,5	4,6 ± 0,3	16,4 ± 0,3	1084 ± 28	18,0 ± 0,5	6,9 ± 0,5	5,4 ± 0,3
Mannit i.v.	$39{,}8^{*} \pm 0{,}8$	$13{,}9^{***} \pm 0{,}8$	$12{,}9^{***} \pm 0{,}3$	1088 ± 47	$22{,}8^{***} \pm 0{,}8$	$12{,}1^{***} \pm 0{,}3$	5,4 ± 0,3
Sulfat i.v.	37,6 ± 0,8	$10{,}8^{***} \pm 1{,}0$	$13{,}6^{***} \pm 0{,}3$	1042 ± 34	$22{,}3^{**} \pm 1{,}0$	$10{,}3^{***} \pm 0{,}7$	5,9 ± 0,2
5,4% NaCl i.v.	36,0 ± 1,0	4,4 ± 0,2	15,9 ± 0,5	1009 ± 54	18,2 ± 0,5	7,5 ± 0,5	5,4 ± 0,2
Glucose i.v.	37,5 ± 0,8	5,4 ± 0,7	15,9 ± 0,3	1061 ± 45	19,0 ± 0,7	$8{,}7^{*} \pm 0{,}7$	5,4 ± 0,2

Alle Werte sind Mittelwerte $\bar{x} \pm s_{\bar{x}}$ von Gruppen von 8 Tieren. Angaben von Durchmesser, Lumen und Wandstärke in μ. — 0 = Querschnitt-Oberfläche der Epithelzellschicht in μ^2; Rechnung s. Text. Alle Mittelwerte wurden mit denen der Kontrollgruppe (0,9% NaCl i.v.) verglichen. Signifikante Unterschiede sind mit * = $P < 0{,}05$, ** = $P < 0{,}01$ und *** = $P < 0{,}001$ bezeichnet; das Fehlen einer Bezeichnung bedeutet, daß der Unterschied nicht statistisch signifikant ist ($P > 0{,}05$)

Tabelle 4. *Dimensionen der distalen Tubuli und der kleinen Sammelröhren bei Kontrollen (0,9% NaCl i.v.), Durst und verschiedenen Diuresearten*

Behandlung	Distale Tubuli				Kleine Sammelröhren		
	Durchmesser	Lumen	Wandstärke	0	Durchmesser	Lumen	Wandstärke
Durst	33,2 ± 0,7	9,5 ± 0,8	11,8 ± 0,3	788 ± 33	20,8 ± 0,7	8,5 ± 0,5	6,1 ± 0,2
Wasser p.o.	34,4 ± 1,0	11,3 ± 0,5	11,5 ± 0,3	814 ± 39	21,6 ± 0,7	9,3 ± 0,5	5,9 ± 0,2
0,9% NaCl p.o.	33,6 ± 0,7	10,0 ± 0,5	11,6 ± 0,5	791 ± 36	21,6 ± 0,5	9,3 ± 0,5	6,2 ± 0,2
0,9% NaCl i.v.	33,2 ± 0,8	10,6 ± 0,5	11,3 ± 0,3	775 ± 42	21,1 ± 1,0	9,2 ± 0,7	5,9 ± 0,2
Mannit i.v.	34,9 ± 1,6	14,2 ± 1,0**	10,3 ± 0,5	808 ± 70	23,1 ± 0,7	11,5 ± 0,7*	5,9 ± 0,3
Sulfat i.v.	34,7 ± 1,3	13,4 ± 0,7**	10,5 ± 0,5	790 ± 61	22,6 ± 0,5	11,1 ± 0,3*	5,7 ± 0,2
5,4% NaCl i.v.	33,2 ± 1,2	10,2 ± 0,8	11,6 ± 0,3	792 ± 49	20,0 ± 0,5	8,2 ± 0,3	6,1 ± 0,3
Glucose i.v	33,1 ± 1,5	11,5 ± 0,8	10,8 ± 0,7	769 ± 73	21,9 ± 0,8	9,5 ± 0,5	6,1 ± 0,3

Alle Werte sind Mittelwerte $\bar{x} \pm s_{\bar{x}}$ von Gruppen von 8 Tieren. Angaben von Durchmesser, Lumen und Wandstärke in μ. — 0 — Querschnitt-Oberfläche der Epithelzellschicht in μ^2; Rechnung s. Text. Alle Mittelwerte wurden mit denen der Kontrollgruppe (0,9% NaCl i.v.) verglichen. Signifikante Unterschiede sind mit * = $P < 0{,}05$, ** = $P < 0{,}01$ und *** = $P < 0{,}001$ bezeichnet; das Fehlen einer Bezeichnung bedeutet, daß der Unterschied nicht statistisch signifikant ist ($P > 0{,}05$)

Harnstauungsniere sind vor allem das Sammelrohrsystem und die distalen Tubuli sehr stark erweitert, während die Lumina der proximalen Tubuli zwar auch erweitert sind, aber immer noch wesentlich kleiner bleiben als die der distalen Tubuli.

Die Dimensionen der Glomerula sind während der Mannit- und der Sulfatdiurese gegenüber Kontrollen nicht verändert. Die Glomerula erscheinen manchmal — aber durchaus nicht immer — im gefärbten Schnittpräparat etwas blutarm, sind aber niemals kollabiert. Die Ausmessung ergibt bei der Mannit- und Sulfatdiurese für die Lumina der proximalen Tubuli eine Zunahme des Durchmessers auf das 2—3fache des Normalwerts, für die Lumina der dünnen Stücke der Henleschen Schleifen und diejenigen der distalen Tubuli sowie auch der kleinen Tubuli colligentes eine Zunahme auf ungefähr das $1\frac{1}{2}$fache des Normalwerts. Über die Signifikanz der ermittelten Zunahmen unterrichten Abb. 2 und die Tab. 2, 3 und 4. Die Veränderungen erscheinen nach Sulfat insgesamt etwas weniger ausgeprägt als nach Mannit; zwischen den Werten für die beiden Gruppen bestehen aber keine signifikanten Unterschiede. Die Erweiterung der Lumina geht wohl in der Regel mit einer nicht immer sicher nachweisbaren Vergrößerung des Gesamtdurchmessers einher (Tab. 2, 3 und 4). Die Epithelzellen erscheinen infolgedessen (Abb. 1b) abgeplattet. Die Abplattung ist aber nur Ausdruck einer Umlagerung, nicht aber einer Volumenveränderung der Epithelzellen selbst. Für die proximalen und die distalen Tubuli sind in Abb. 2 und Tab. 2 die aus den Radien des Lumen und Gesamtdurchmessers errechneten Oberflächen der Epithelzellen im Schnitt (senkrecht zur Verlaufsrichtung) mit ihren Streuungen angegeben: Wenn während der Mannit- und der Sulfatdiurese keine Änderungen in der Länge der proximalen und distalen Tubulusabschnitte

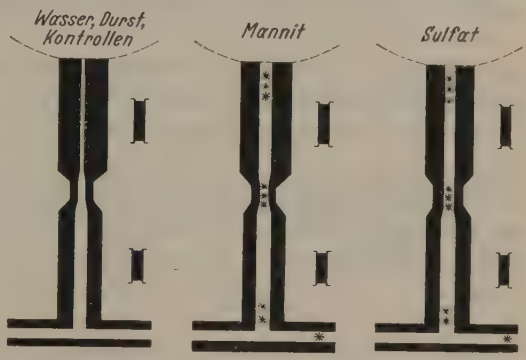


Abb. 2. *Schematische Darstellung von Längsschnitten durch proximalen Tubulus (oben), Pars tenuis der Henleschen Schleife (Mitte), distalen Tubulus (unten) und kleines Sammelrohr (unten waagrecht) bei Kontrollen, Wasserdiurese und Durst und bei osmotischer Diurese nach i.v. Injektion von Mannit und von Sulfat.* Das Bild der osmotischen Diurese nach i.v. Injektion von 6fach hypertonischer NaCl- oder Glucoselösung entspricht dem Bild bei Wasserdiurese und den Kontrollen. Mit * = $P < 0{,}05$, ** = $P < 0{,}01$ und *** = $P < 0{,}001$ sind die Signifikanzen der Unterschiede im Durchmesser der Lumina bezeichnet. Für Lumina und Wanddicken sind in der Abbildung jeweils die Mittelwerte der Tab. 2—4 eingesetzt. Die schwarzen Säulen rechts neben den schematischen Darstellungen geben das aus der Oberfläche des Querschnitts errechnete Volumen der Epithelzellen für den proximalen und den distalen Tubulus als Mittelwert $\bar{x} \pm s_{\bar{x}}$ an (vgl. Text)

eintreten sollten, darf diese Querschnitt-Oberfläche als Maß des Volumens der Zellen angesehen werden. Dieses Volumen der Zellen scheint sich trotz der starken Zunahme der Lumina der Tubuli nicht zu verändern.

Auf dem Höhepunkt der osmotischen Diurese nach der i.v. Injektion von Glucose oder von 6fach hypertonischer NaCl-Lösung lassen sich keinerlei signifikante Veränderungen im histologischen Bild des fixierten Nierenschnitts nachweisen, wenn man von einer ganz geringfügigen und unsicheren Erweiterung der Lumina der dünnen Teile der Henleschen Schleifen nach der Glucose-Injektion absehen will (Tab. 3).

Auch auf der Höhe der Wasserdiurese, auf der Höhe der Diurese nach oraler Gabe von 0,9% NaCl-Lösung und im Durst sind die Maße der verschiedenen Nephronenanteile und damit das histologische Bild des fixierten gefärbten Nierenschnitts gegenüber Kontrollen völlig unverändert.

Tabelle 5. *Wassergehalt der Niere auf dem Höhepunkt der osmotischen und der Wasserdiurese im Vergleich zu Kontrolltieren und zu durstenden Tieren*

Behandlung	Gewichts-% Wasser	P_2
Durst	$77{,}52 \pm 0{,}31$	***
Wasser p. o.	$^{**}78{,}36 \pm 0{,}26$	***
0,9 NaCl p. o.	$77{,}43 \pm 0{,}32$	***
0,9% NaCl i.v.	$77{,}23 \pm 0{,}95$	***
Mannit i.v.	$^{***}80{,}15 \pm 0{,}27$	———
Sulfat i.v.	$^{***}79{,}09 \pm 0{,}39$	*
5,4% NaCl i.v.	$76{,}90 \pm 0{,}28$	***
Glucose i.v.	$^{*}78{,}04 \pm 0{,}34$	***

Alle Angaben in Gewichts-% Wasser: Mittelwerte $\bar{x} \pm s_{\bar{x}}$. An den Zahlen sind die Signifikanzen der Unterschiede gegenüber der Kontrollgruppe (0,9% NaCl i.v.) durch * = $P < 0{,}05$, ** = $P < 0{,}01$ und *** = $P < 0{,}001$ angegeben. In der Spalte P_2 sind die Signifikanzen der Unterschiede gegenüber der mit Mannit behandelten Gruppe in gleicher Weise bezeichnet.

Der Wassergehalt des Nierengewebes ist, wie früher beschrieben (Brunner, Kuschinsky u. Peters 1958 c), auf der Höhe der Wasserdiurese gegenüber Kontrollwerten signifikant gesteigert (Tab. 5). Auf der Höhe einer osmotischen Diurese, die durch Mannit oder durch Sulfat ausgelöst wird, ist er wesentlich höher (Unterschied hoch signifikant) als während der Wasserdiurese; bei der osmotischen Diurese nach der Einwirkung von Mannit liegt der Wassergehalt des Nierengewebes signifikant höher als nach Injektion von Sulfat. Bei der — vielleicht etwas geringeren — osmotischen Diurese nach der Injektion von hypertonischer Glucose oder NaCl-Lösung

nimmt der Wassergehalt der Nieren etwa ebenso stark zu wie bei der Wasserdiurese, bleibt aber signifikant geringer als nach der Injektion von Mannit. Im Durst scheint der Wassergehalt des Nierengewebes gegenüber Tieren, die nicht gedurstet haben und 0,5 ml 0,9% NaCl-Lösung i.v. erhielten, oder gegenüber Tieren auf der Höhe der Diurese nach oraler Gabe von 0,9% NaCl-Lösung nicht gesenkt zu sein (Tab. 5). Bei der Diurese nach i.v. Injektion von hypertonischer NaCl-Lösung ist der Wassergehalt des Nierengewebes gegenüber den Kontrollen nicht verändert; hier besteht also eine osmotische Diurese mit gleichzeitigem niedrigen Wassergehalt des Nierengewebes.

Da sowohl die absoluten Nierengewichte als auch die auf das Körpergewicht bezogenen Nierengewichte ziemlich stark streuen, ließen sich keine signifikanten Unterschiede des Nierengewichts zwischen der Kontroll-, Wasser-, Sulfat-, Glucose-, hypertonischer NaCl-, Durst- und isotonischer NaCl-Gruppe nachweisen. Dagegen war bei der Mannitgruppe das relative Gewicht einer Niere, ausgedrückt in Promille des Körpergewichts, mit $5{,}55 \pm 0{,}19‰$ gegenüber der Kontrollgruppe mit $4{,}47 \pm 0{,}16‰$ hoch signifikant ($P < 0{,}001$) gesteigert.

Diskussion

Bei der osmotischen Diurese nach der einmaligen i.v. Injektion von Mannit oder Sulfat nimmt bei Ratten und Mäusen der Durchmesser der Lumina der proximalen Tubuli sehr stark, derjenige der Lumina der distalen Tubuli und der kleinen Sammelröhren weniger stark, aber doch eindeutig zu. Gleichzeitig erscheinen die Epithelzellen niedriger und die Gesamtdurchmesser der verschiedenen Tubulusabschnitte nehmen entweder nur wenig oder überhaupt nicht eindeutig zu. Die Möglichkeit schien gegeben, daß die Lumenerweiterung auf intramortale oder postmortale, durch die geringfügige Zunahme des osmotischen Drucks im Primärharn bedingte Schrumpfungsvorgänge an den Epithelzellen zurückzuführen sein könnte. Gegen die Annahme einer Schrumpfung der Epithelzellen vor oder nach dem Tod der Tiere spricht aber der Befund, daß sich die Querschnitt-Oberfläche der Tubulusepithelzellen trotz der Erweiterung des Lumens nicht verändert (Abb. 2, Tab. 2 und Tab. 3). Wenn also überhaupt eine Schrumpfung der Zellvolumina stattgefunden hätte, so müßte sie zu einer Verkürzung der Tubuli in der Längsrichtung führen.

Obgleich Veränderungen der Gesamttubuluslänge im Verlauf von Erkrankungen der Nephren beschrieben worden sind (Oliver, Bloom u. MacDowell 1941; Oliver 1945; Oliver 1953), erscheint eine reversible Verkürzung des ganzen Tubulusapparats innerhalb weniger Minuten recht unwahrscheinlich; darüber hinaus würde sie wahrscheinlich zu einer Veränderung des Verhältnisses der Durchmesser von Rinde und Mark führen, die in unseren Präparaten nicht nachzuweisen war.

Gegen die Annahme einer osmotisch bedingten Schrumpfung der Epithelzellen als Ursache der Lumenerweiterung spricht weiterhin der signifikant höhere Wassergehalt derjenigen Nieren, deren Tubuli unter der Einwirkung von Mannit oder Sulfat erweitert waren. Eine osmotische Schrumpfung der Epithelzellen würde zwar zu einer Verschiebung von Wasser zwischen dem Inneren der Epithelzellen und dem Tubuluslumen führen, dürfte aber den Gesamtwassergehalt der Nieren kaum verändern. Schließlich haben wir zur Ausschließung der Möglichkeit eines postmortalen Artefakts einige Mäusenieren nach der Injektion von Mannit sehr schnell entnommen, sofort in flüssige Luft geworfen, gleichzeitig mit dem Auftauen fixiert und angefärbt. Die so erhaltenen Präparate zeigen wenig Einzelheiten, lassen aber ohne weiteres die gleiche Erweiterung der Tubuluslumina erkennen wie frisch fixierte und gefärbte Präparate.

Die beobachtete Erweiterung des ganzen Tubulussystems bei der osmotischen Mannit- und Sulfatdiurese darf daher wahrscheinlich als Folge einer Zunahme der in den Lumina enthaltenen Flüssigkeitsmengen und damit des inneren Drucks angesehen werden. Tatsächlich wurde mit Hilfe der in den letzten Jahren entwickelten Methoden zur Messung des intratubulären Drucks durch Mikropunktion an der Rattenniere (Wirz 1955; Gottschalk u. Mylle 1956b) gefunden, daß bei stärkerer osmotischer Diurese durch Infusion von Mannit, Saccharose oder hypertonischer NaCl-Lösung zunächst der Druck in den proximalen Tubuli und bei noch stärkerer Zunahme der Diurese auch in den distalen Tubuli der Ratte zunimmt (Gottschalk u. Mylle 1956a).

Schon länger war übrigens bekannt, daß bei Hunden bei osmotischer Diurese der sogenannte „intrarenale" Druck, interstitielle Druck oder „Nadeldruck" (Winton 1956) ansteigt (Montgomery, Davis, Prine u. Swann 1950; Gottschalk 1952; Miles u. de Wardener 1954; Winton 1951). Dieser „intrarenale Druck" wird durch Einstechen einer relativ großen Nadel ins Parenchym der Nierenrinde gemessen, er wird wahrscheinlich sowohl vom Druck im Tubulussystem als auch vom Druck in den Interstitien als auch in den Nierenvenolen und -venen beeinflußt (Winton 1956).

Die osmotische Diurese beruht nach der allgemein herrschenden Ansicht (Smith 1956; Robinson 1954) nicht auf einer Zunahme des Glomerulumfiltrats pro Zeiteinheit, da die Inulin- und andere vergleichbare „glomeruläre" Clearancen nicht zunehmen (Corcoran, del Greco u. Masson 1956; del Greco u. Wardener 1956). Als Ursache der osmotischen Diurese wird vielmehr eine Störung der sogenannten obligaten Wasserrückresorption (Smith 1956) im proximalen Tubulus angesehen. Die Störung soll dadurch zustande kommen, daß infolge der Anwesenheit des osmotischen Diureticums trotz der aktiven Rückresorption von Natrium im proximalen Tubulus der osmotische Druck im Lumen nicht absinkt und deshalb kein oder nur wenig Wasser rückresorbiert wird. Dieser Vorgang würde zur Zunahme des Inhalts und damit des Drucks im proximalen Tubulus führen und würde somit die beobachteten Veränderungen der Weite sowohl der proximalen als auch der distalen Tubulusabschnitte erklären. Im Gegensatz zur osmotischen Diurese wird die Wasserdiurese auf eine Störung der „aktiven" Wasserrückresorption im distalen Tubulus bei normaler Rückresorption im proximalen Tubulus zurückgeführt.

Da infolge dieses Vorgangs bei gleicher Geschwindigkeit der Wasser- und der osmotischen Diurese in den unteren Anteilen der distalen Tubuli und in den Sammelröhren ebensoviel Flüssigkeit vorhanden sein müßte, und da außerdem in beiden

Fällen der Abflußwiderstand der gleiche sein dürfte, sollten distale Tubuli und Sammelröhren bei Wasserdiurese und osmotischer Diurese gleich weit sein. Das ist aber im fixierten und gefärbten Schnitt nicht der Fall. Der Widerspruch läßt sich vielleicht durch die Annahme klären (Wirz 1956), daß der bei der Wasserdiurese ausgeschaltete oder abgebremste Anteil an der Gesamtwasserrückresorption nicht in den distalen Tubuli, sondern in den Sammelröhren unterhalb der in unseren Versuchen gemessenen kleinsten Sammelröhren stattfindet.

Eine einfachere Deutung der beobachteten Bilder — und der von Gottschalk u. Mylle (1956a) gemessenen Druckveränderungen — wäre die, daß bei osmotischer Diurese die Menge des in der Zeiteinheit in die Bowmansche Kapsel und das Lumen des proximalen Tubulus abgegebene Flüssigkeitsmenge („Glomerulumfiltrat") zunimmt, bei der Wasserdiurese dagegen die zusätzlich ausgeschiedene Flüssigkeitsmenge im distalen Teil des distalen Tubulus und darunter in die Tubuluslumina gelangt. Diese Deutung wäre nur dann möglich, wenn man das wohlbegründete, aber ebensowenig beweisbare wie widerlegbare Dogma der Identität der Inulin-Clearance mit der Glomerulumfiltratmenge pro Zeiteinheit fallen lassen dürfte.

Besonders überraschend ist die Tatsache, daß die morphologischen Veränderungen, die bei der osmotischen Diurese nach Mannit- und Sulfatinjektionen auftreten, bei der osmotischen Diurese nach hypertonischen NaCl- und Glucose-Injektionen vollständig fehlen. Wenn die Ursache dieser Diskrepanz die in unseren Versuchen vielleicht etwas kleinere Diurese nach hypertonischer NaCl- und Glucoselösung wäre, müßte man wenigstens angedeutete Veränderungen der Nierentubuli im für Mannit- und Sulfatdiuresen beschriebenen Sinn erwarten. Die „osmotische" Diurese nach der Injektion von hypertoner NaCl- oder Glucoselösung scheint sich somit in ihrem Mechanismus von der gleichfalls „osmotischen" Diurese nach Mannit- und Sulfat-Injektionen zu unterscheiden. Darüber hinaus besteht ein hoch signifikanter Unterschied ($P < 0{,}001$) zwischen dem Wassergehalt des Nierengewebes bei der „osmotischen" Diurese nach Injektionen von Glucose oder von hypertonischer NaCl-Lösung, der wiederum auf Unterschiede zwischen diesen beiden Diureseformen hinzuweisen scheint.

Summary

Histological fixed and stained sections were obtained from the kidneys of young female rats at the height of either water or osmotic diuresis. Measurements of the diameter of cross sections of various parts of the nephrons were made; simultaneously the water content of the kidney tissue was determined by drying in an oven.

Diuresis was induced by a single intervenous injection of 0.5 ml. per rat of Mannitol or sodium sulphate solutions six times hypertonic to plasma. At the height of diuresis a considerable increase in the diameters of the lumina of the proximal tubules, the thin segments, the distal tubules and of the small collecting tubules was obtained. The greatest increase occured in the lumina of the proximal tubules. The diameters of the glomerular tufts and of Bowmans capsules remained unchanged.

The increase in the tubular lumina was apparently due to distension. At the same time the water content of the kidney tissue increased from 77,2 ± 0,1 to 80,1 ± 0,3 (Mannitol) or to 79,1 ± 0,4 (sodium sulphate) grammes of water per 100 grammes of fresh kidney tissue.

In other groups of rats diuresis was caused either by intravenous injection of the same dose of NaCl or glucose solutions six times hypertonic to plasma or by oral administration of water (8 ml/rat). At the height of diuresis neither the appearance nor the dimensions of the glomeruli and tubuli differed from the controls. In water and in glucose diuresis a significant increase in the water content of kidney tissue to 78,4 ± 0,3 (water) or 78,0 ± 0,3 (glucose) per cent of water occured. This increase was significantly smaller than during „osmotic" diuresis due to Mannitol or sodium sulphate. During osmotic diuresis due to the intravenous injection of hypertonic sodium chloride solution the water content of kidney tissue did not increase. — There was no significant difference between the maximal rates of diuresis obtained after the different osmotic diuretics or after the oral administration of water.

No change in the histological picture of the kidney or its water content occured after one hour's thirst or during the small diuresis induced by oral administration of isotonic saline.

Wir danken Frl. R. Engel für fleißige technische Mitarbeit.

Literatur

Brunner, H., G. Kuschinsky u. G. Peters: Die Wasserdiurese und ihre Begrenzung bei ein- oder mehrmaliger oraler Gabe von Wasser bei der Ratte. Arch. exper. Path. u. Pharmakol. **233**, 1 (1958a).

Brunner, H., G. Kuschinsky u. G. Peters: Ausscheidung und Verteilung von Wasser und Mineralien nach oralen Gaben von physiologischer NaCl-Lösung bei der Ratte. Arch. exper. Path. u. Pharmakol. **233**, 39 (1958b).

Brunner, H., G. Kuschinsky u. G. Peters: Die Verteilung von Wasser, Natrium und Kalium im Organismus der Ratte nach einer großen oralen Wassergabe. Arch. exper. Path. u. Pharmakol. **233**, 19 (1958c).

Corcoran, A. C., F. del Greco and G. M. C. Masson: Osmotic (Mannitol) diuresis in the anesthetized rat. Effectiveness of water conserving mechanisms. Amer. J. Physiol. **187**, 515 (1956).

Del Greco, F., and H. E. de Wardener: The effect on urine osmolarity of a transient reduction in glomerular filtration rate and solute output during a "water" diuresis. J. of Physiol. **131**, 307 (1956).

Gottschalk, C. W.: A comparative study of renal interstitial pressure. Amer. J. Physiol. **169**, 180 (1952).

Gottschalk, C. W., and M. Mylle: Micropuncture study of pressures in proximal and distal tubules of rat kidney and their relation to rate of urine flow. (Abstract) Amer. J. Physiol. **187**, 601 (1956a).

Gottschalk, C. W., and M. Mylle: Micropuncture studies of pressures in proximal tubules and peritubular capillaries of the rat kidney and their relation to ureteral and renal venous pressures. Amer. J. Physiol. **185**, 430 (1956b).

House, E. L., P. F. Nace and J. P. Tassoni: Alloxan diabetes in the hamster: organ changes during the first day. Endocrinology (Springfield, Ill.) **59**, 433 (1956).

Kuschinsky, G., u. H. Vorherr: Der Einfluß von hypertonischen Lösungen auf die Gefäßdarstellung und Tubulusweite in der Mäuseniere. (In Vorbereitung.)

Miles, B. E., and H. E. de Wardener: Intrarenal pressure. J. of Physiol. **123**, 131 (1954).

Montgomery, A. V., J. C. Davis jr., J. M. Prine and H. G. Swann: The intrarenal pressure. J. of Exper. Med. **92**, 637 (1950).

Oliver, J.: New directions in renal morphology: a method, its results and its future. Harvey Lectures **40**, 102 (1945).

Oliver, J.: Correlations of structure and function and mechanisms of recovery in acute tubular necrosis. Amer. J. Med. **15**, 535 (1953).

Oliver, J., F. Bloom and M. MacDowell: Structural and functional transformations in the tubular epithelium of the dog's kidney in chronic Bright's disease and their relation to mechanisms of renal compensation and failure. J. of Exper. Med. **73**, 141 (1941).

Platt, R., M. H. Roscoe and F. W. Smith: Experimental renal failure. Clin. Sci. **11**, 217 (1952).

Robinson, J. R.: Reflections on Renal Functions. Oxford (England): Blackwell Scientific Publications 1954.

Smith, H. W.: Principles of Renal Physiology. New York: Oxford University Press 1956.

Winton, F. R.: Hydrostatic pressures affecting the flow of urine and blood in the kidney. Harvey Lectures **47**, 21 (1951).

Winton, F. R.: The pressures and flows of blood and urine within the kidney. In: Modern Views on the Secretion of Urine. — The Cushny Memorial Lectures: herausgegeben von F. R. Winton, London: J. & A. Churchill Ltd. 1956.

Wirz, H.: Druckmessung in Capillaren und Tubuli der Niere durch Mikropunktion. Helvet. physiol. Acta **13**, 42 (1955).

Wirz, H.: Die Wirkung des antidiuretischen Hormons in der Säugetierniere. Schweiz. med. Wschr. **1956**, 1261.

Prof. Dr. G. Kuschinsky, Pharmakol. Inst. der Univ. Mainz

Arch. exper. Path. u. Pharmakol., Bd. 233, S. 72—97 (1958)

Aus dem Pharmakologischen Laboratorium der C. F. Boehringer & Söhne G.m.b.H. Mannheim-Waldhof

Pharmakologie des Rauwolfia-Alkaloids Raubasin (δ-Yohimbin-Ajmalicin)*

Von

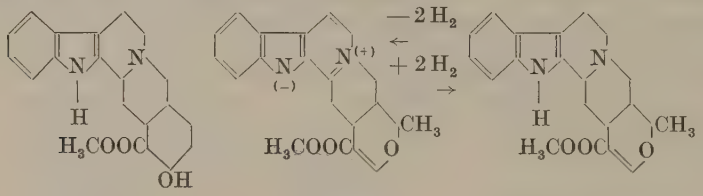
G. Kroneberg

Mit 8 Textabbildungen

(Eingegangen am 2. August 1957)

Vor einiger Zeit berichteten Popelak, Spingler u. Kaiser über die Auffindung eines neuen Rauwolfia-Alkaloids, das zunächst als Alkaloid No. II und später als *Raubasin* (Haack u. Mitarb.) bezeichnet wurde. Das Alkaloid hatte bemerkenswerte adrenergisch blockierende Wirkungen, die wir in Versuchen am Blutdruck und an der Nickhaut der Katze näher beschrieben haben (Achelis u. Kroneberg; Kroneberg u. Achelis).

Etwas später isolierten amerikanische und indische Autoren (Klohs u. Mitarb.; Weisenborn, Moore u. Diassi) dasselbe Alkaloid und wiesen seine Identität mit dem schon bekannten (Heinemann), ursprünglich als mit Yohimbin isomer angesehenen *δ-Yohimbin* nach. Von ihnen wurde auch die nahe Verwandtschaft des Raubasins mit dem Rauwolfia-Alkaloid *Serpentin* demonstriert, die aus den nachfolgenden Formelbildern ersichtlich ist.



Yohimbin Serpentin Raubasin (Ajmalicin)

Aus der chemischen Struktur geht hervor, daß Yohimbin und Raubasin keine Isomeren, sondern zwei in ihrem molekularen Aufbau verschiedene Verbindungen sind.

Schließlich hat sich nachträglich herausgestellt, daß Raubasin unter dem Namen *Ajmalicin* bereits von Siddiqui (1931) isoliert worden ist, dem also die Priorität zukommt.

Neuss, Boaz u. Forbes haben das Alkaloid 1954 unter der Bezeichnung „Alkaloid F" beschrieben.

Wie ein Vergleich der chemischen Formeln zeigt, steht Raubasin in nächster Verwandtschaft zum Serpentin. Es ist ein hydriertes Serpentin,

* Herrn Prof. Dr. med. F. Hildebrand, Gießen, zum 70. Geburtstag gewidmet.

das man durch Entzug von 4 H-Atomen wiederum in Serpentin überführen kann (Klohs, Draper, Keller, Malesch u. Petracek).

Diese Tatsache ist insofern auch von pharmakologischem Interesse, als dem Serpentin die adrenergisch-blockierenden Wirkungen des Raubasins fehlen. In dieser Beziehung steht Raubasin dem Yohimbin näher als dem Serpentin. Wie die pharmakologische Analyse aber noch zeigen wird, bestehen wichtige Unterschiede zum Yohimbin, die Raubasin unter anderem auch von den echten Yohimbinisomeren abgrenzen.

In der umfangreichen Literatur über die Sympathicolytica finden sich in letzter Zeit verschiedene Hinweise, daß die im Tierexperiment nachgewiesene Hemmung der Adrenalin- und Nor-Adrenalinwirkung nur ein Teil und im Hinblick auf die Therapie nicht einmal der wichtigste im Wirkungsbild verschiedener Angehöriger dieser Stoffgruppe zu sein scheint. So finden Rothlin u. Mitarb. bei den hydrierten Mutterkornalkaloiden neben der adrenergisch-blockierenden Wirkung eine für den blutdrucksenkenden Effekt wesentliche Hemmung der vasomotorischen Zentren. Bernsmeier hat auf die Diskrepanz zwischen der therapeutischen Dosierung und der adrenalinhemmenden Potenz verschiedener Sympathicolytica hingewiesen und kommt zu dem Schluß, daß deren Erfolge in der Therapie nicht mit der antiadrenergischen Komponente, sondern mit anderen Eigenschaften zusammenhängen müssen.

Zweifellos spielt die *Spezifität der adrenergischen Hemmwirkung* für die pharmakologische Charakterisierung eine entscheidende Rolle, denn je größer der Abstand zwischen den adrenergisch hemmenden und den Dosen mit andersartiger Wirkung ist, um so geringer wird die Gefahr einer unzureichenden und einseitigen Deklarierung als „Sympathicolyticum" sein. Wie unsere Untersuchungen aber zeigen werden, kann die Spezifität von der Art des Testobjektes abhängen, so daß z. B. ein isoliertes Organ eine größere Spezifität vortäuscht als man am intakten Tier nachher nachweisen kann. Man wird deshalb eine Substanz mit sympathicolytischer Wirkung nur nach einer umfassenden Analyse ausreichend beurteilen können, wobei für den Wirkungstypus die adrenalin- oder nor-adrenalinhemmenden Qualitäten nicht die Bedeutung zu haben brauchen, die man ihnen, nicht zuletzt auf Grund der einfachen experimentellen Beweisführung, häufig zuschreibt.

Wir haben deshalb in der vorliegenden Arbeit nicht nur unsere früheren Ergebnisse über die adrenergisch-blockierenden Raubasinwirkungen erweitert, sondern auch die *Kreislaufwirkung* analysiert und verschiedene *zentrale Wirkungen* des Alkaloids näher untersucht.

Methodik

Raubasinlösungen. Wegen der geringen Löslichkeit des Alkaloids in Wasser wurden die Versuche anfangs mit einem Gemisch von Raubasin und Ascorbinsäure 1:10 durchgeführt. Die Mischung wurde durch Lösen der beiden Substanzen in Wasser und Eindampfen im Vakuum hergestellt und war in Wasser bis zur Raubasinkonzentration von 1% löslich. Die Lösung wurde mit NaOH auf p_H 5 gebracht und auf die gewünschte Konzentration weiter verdünnt. Mit NaOH entsprechend eingestellte Ascorbinsäurelösungen wurden für die Kontrollversuche benutzt. Für den größten Teil der Versuche stand später ein lösliches Raubasinphosphat zur Verfügung, das vor allem für die Versuche in vitro und für die i.v. Injektion benutzt wurde. Bei den peroralen Versuchen an Hunden erhielten die Tiere das kristallisierte, ungelöste Raubasin-Ascorbinsäuregemisch mit Hackfleisch vermischt.

1. Toxicitätsversuche

Die Bestimmung der akuten DL 50 erfolgte nach der Methode von Litchfield u. Wilcoxon. In einigen Versuchen konnte nur die höchste, noch nicht tödliche Dosis ermittelt werden, da eine Steigerung der Dosis wegen der Unlöslichkeit des Alkaloids nicht möglich war. (Dos. let. minima = 20% Letalität.)

In *chronischen Fütterungsversuchen* an Ratten wurden 5, 10, 20 und 40 mg/kg Raubasin in Form des Ascorbinsäuregemisches 24 Wochen lang täglich mit der Schlundsonde verabfolgt. Die Kontrollgruppen erhielten entsprechende Ascorbinsäuremengen. Die Ratten wurden 2 mal in der Woche gewogen und von 2 Tieren jeder Gruppe vor Beginn der Behandlung sowie 8, 16 und 24 Wochen später ein kompletter Blutstatus aufgenommen. Am Schluß des Versuches wurden die Tiere dekapitiert und Leber, Niere, Gehirn, Herzmuskel, Gonaden und Nebennieren histologisch untersucht.

2. Isolierte Organe

Kaninchenuterus nach Broom u. Clark. Die Versuche am *isolierten Meerschweinchen-* und *Kaninchendarm* sowie an der *Meerschweinchensamenblase* wurden in der üblichen Anordnung nach Magnus durchgeführt. Das *isolierte Kaninchenohr* wurde über die Zentralarterie mit sauerstoffgesättigter Tyrodelösung von 25° C durchströmt. Zur Tonisierung dienten Nor-Adrenalin-, Bariumchlorid- oder Angiotoninlösungen. Der Nor-Adrenalinlösung waren 3 mg-% Ascorbinsäure als Oxydationsschutz zugesetzt. Die Tropfgeschwindigkeit der aus dem Präparat ablaufenden Flüssigkeit wurde mit einem Ordinatenschreiber registriert (Heuwing-Braun). Raubasin und die Vergleichsalkaloide, die in der jeweiligen Perfusionslösung gelöst waren, wurden in einem Teil der Versuche in den Zuführungsschlauch injiziert (0,1 cm^3 in 3 sec) und Kontrollinjektionen mit entsprechenden „Leerlösungen" durchgeführt. Es wurden nur Versuche gewertet, bei denen die Leerlösungen keine Wirkung hatten. In andern Versuchen wurden am nicht tonisierten Präparat zunächst die Kontraktionssubstanzen (Adrenalin, Nor-Adrenalin, $BaCl_2$ oder Angiotonin) in den Schlauch injiziert und ihre Wirkung ermittelt, sodann auf die Raubasinperfusion umgeschaltet und die Abschwächung der Wirkung durch die jeweilige Raubasinkonzentration festgestellt.

Für die Versuche am *isolierten Meerschweinchenvorhof* benutzten wir die Methode von Holtz u. Westermann.

3. Darm in situ

An *Katzen* wurde in Chloralose-Urethan-Narkose (0,8 g/kg Urethan + 0,025 g/kg Chloralose i.v.) eine Ballonsonde durch den Oesophagus und den Magen in das Jejunum geführt und an ein Wassermanometer angeschlossen. Der Zuführungsschlauch wurde zur Fixierung der Sonde am Pylorus eingebunden. In einem Teil der Versuche wurde die Sonde nach Laparotomie direkt in das distale Stück einer abgebundenen Ileumschlinge eingebunden.

Für die Versuche am *Kaninchendarm* wurde die Suspensionsmethode von Trendelenburg benutzt. Narkose 1,5 g/kg Urethan s. c.

4. Blutdruckversuche an der Katze

Registrierung des arteriellen Druckes aus der A. femoralis mit einem Hg-Manometer oder dem Broemserschen Glasplattenmanometer. Zur Gerinnungsverhinderung wurde der Zuführungsschlauch mit einer 20%igen Xylanester-Kochsalzlösung gefüllt. Injektionen in die V. femoralis.

5. Extremitätendurchblutung und -blutdruckregistrierung am Hund

Der arterielle und venöse Druck wurden in einem Teil der Versuche mit STATHAM-Elementen und einem Atlas-4fach-Schreiber optisch registriert. An diesen war auch das zur Messung des Durchströmungsvolumens in die A. femoralis eingebaute *Shipley-Rotameter* angeschlossen[1]. In weiteren Versuchen wurde bei sonst gleicher Anordnung ein Direktschreiber der Fa. Schwarzer, München, benutzt. Die Hunde waren mit 2 mg/kg Morphin s. c. + 80 mg/kg Chloralose i.v. narkotisiert und erhielten zur Gerinnungshemmung 0,25—0,5 cm^3/kg Xylanester Boehringer i.v.

6. Kreislaufanalysen nach Wezler-Boeger

An wachen Carotisschlingenhunden wurde die Arterienwand durch einen auf das inkompressible Druckübertragungssystem gegebenen Vordruck entlastet, der 5 mm Hg über dem auskultatorisch vorher festgestellten diastolischen Druck lag. Durch die Ausschaltung der Arterienwandspannung und wegen der fehlenden Volumenverschiebung im Registriersystem kann der Druck dämpfungsfrei gemessen werden. Die Druckregistrierung erfolgte mit dem Schwarzerschen Direktschreiber über einen fotoelektrischen Druckreceptor. Der Femoralispuls wurde durch einen fotoelektrischen Elongationsgeber ebenfalls mit dem Schwarzer-Gerät aufgenommen.

7. Rückenmarksreflexe

Zur Registrierung der Rückenmarksreflexe benutzten wir die von KOLL ausführlich beschriebene Methode: Decerebrierung nach SHERRINGTON in Äthernarkose, Durchtrennung des Rückenmarkes bei Th 11—12 zur Verhinderung der Enthirnungsstarre im Bereich der Hinterextremitäten. Bei der Registrierung des *ipsilateralen Beugereflexes* wurden der N. femoralis und obturatorius der gleichen Seite durchschnitten und der zentrale Peroneusstumpf mit Rechteckströmen faradisch gereizt. Impulsdauer 0,5—1 msec, Impulsfrequenz 30—100 Hz, Reizstärke je nach Ansprechbarkeit 0,5—5 Milliamp., Reizdauer 0,5—1 sec. Zur Auslösung des *Patellarreflexes* wurde der von WRIGHT u. SCHWEITZER beschriebene elektromagnetische Hammer benutzt. Der N. ischiadicus und obturatorius wurden durchschnitten.

8. Intraarterielle Nicotinwirkung am Blutdruck der Katze

Durch intraaortale Nicotininjektionen erhält man an der adrenalektomierten, decerebrierten Katze stärkere Blutdrucksteigerungen, die durch Raubasin abgeschwächt werden. Nach Laparotomie in Äthernarkose wurden die Nebennieren exstirpiert, die Katze anschließend nach SHERRINGTON decerebriert, die Carotiden abgebunden und die Vagi durchschnitten. Unter weiterer künstlicher Beatmung wurde ein Polyäthylenkatheter in die A. mesenterica sup. eingebunden, dessen Spitze bis zur Einmündung in die Aorta abdominalis reichte. Blutdruckregistrierung aus der A. carotis, i.v. Injektionen in die V. jugularis am künstlich beatmeten, nicht narkotisierten Tier.

9. Yohimbinkrämpfe an Mäusen

Gruppen zu 10 Mäusen (14—16 g) erhielten Yohimbin s. c. in steigenden Dosen. In Abständen von 15 min wurden die in Einzelkäfigen befindlichen Tiere mit der Pinzette an der Rückenhaut hochgehoben und 10 sec gehalten. Bei positiver Reaktion kommt es zu einer tonischen Streckung der Extremitäten, einem typischen

[1] Die Versuche wurden am Physiologischen Institut der Universität Marburg gemeinsam mit K. GRAF u. W. OVERBECK durchgeführt. Herrn Prof. Dr. H. KRAMER danke ich für die erwiesene Gastfreundschaft.

Schnauzenkrampf und einer Streckung des Kopfes. Die Reaktion findet sich auch nach anderen Krampfgiften, wie z. B. Cardiazol oder Nicotin bei Dosen, die noch keine Spontankrämpfe auslösen. Sie ist als Zeichen einer gesteigerten zentralen Erregbarkeit anzusehen. Ein ähnliches präkonvulsives Stadium wurde von Schoen am Kaninchen nach Cardiazol beschrieben. Das Verfahren hat gegenüber den bei höheren, häufig schon letalen Dosen auftretenden Spontankrämpfen den Vorteil der besseren Erfaßbarkeit der positiv reagierenden Tiere. Die Methode ist außerdem empfindlicher, so daß auch weniger starke Antikonvulsiva getestet werden können.

Für die Auswertung nach Litchfield u. Wilcoxon wurden die innerhalb von 60 min nach der Yohimbininjektion krampfenden Tiere berücksichtigt. Jedes Tier, das bei mindestens einer Ablesung reagierte, galt als positiv. Es wurde die mittlere effektive Dosis (ED 50) bestimmt. Raubasin wurde 10 min vor Yohimbin s. c. injiziert.

10. Brechversuche

Als Versuchstiere dienten 18 Std nüchterne Hunde beiderlei Geschlechts. Zur Erzeugung des Veratrinerbrechens wurden 5 γ/kg eines Veratrumalkaloidgemisches („Unitensen-Neißler") in Abständen von 10 min i.v. injiziert und die Zahl der Injektionen bis zum Auftreten von Erbrechen ermittelt (Brechschwelle). An den gleichen Tieren wurde der Versuch 5—7 Tage später wiederholt mit dem Unterschied, daß mit jeder Injektion gleichzeitig 1 bzw. 2 mg/kg Raubasin gegeben wurden.

Beim *Apomorphin-* und *Strophanthinerbrechen* konnten die emetischen Dosen wegen der geringeren Allgemeinwirkung auf einmal gegeben und die Anzahl der Brechakte gezählt werden. Raubasin mußte wegen der schnellen Wirkung von 0,1 mg/kg Apomorphin s. c. 30 min vorher peroral gegeben werden. Da die emetische Strophanthinwirkung erst mit einer Latenz von 1—2 Std einsetzt, wurden g-Strophanthin (2,5 mg/kg) und Raubasin gleichzeitig peroral verabfolgt.

Um Spätreaktionen zu erfassen, wurde jedes Tier im Anschluß an den letzten Brechakt noch 2 Std beobachtet. Die Versuchsanordnung wurde außerdem gekreuzt, indem einige Tiere zuerst in den Hauptversuch und danach in den Kontrollversuch genommen wurden, um eine Tachyphylaxie auszuschließen.

Präparate

Alle Rauwolfia-Alkaloide wurden von Herrn Dr. Popelak in den chemischen Laboratorien der C. F. Boehringer & Soehne G. m. b. H., Mannheim-Waldhof, isoliert. Verwendet wurden außerdem: *Adrenalin*, *Yohimbin*, *Papaverin*, *Apomorphin* und *Nor-Adrenalin* als Hydrochloride, *Nicotin* als Base, die mit Weinsäure neutralisiert wurde, *g-Strophantin* Boehringer mit einem Wassergehalt von 18%.

Hexamethoniumbromid, *Amphetamin* und *Diphenhydramin* wurden in Form der Handelspräparate benutzt.

Versuche

1. Toxicität und Verträglichkeit des Raubasins

a) Akute Toxicität. Tab. 1 gibt eine Übersicht über die akut tödlichen Dosen bei mehreren Tierarten und verschiedenen Applikationsformen. Infolge der Schwerlöslichkeit des Alkaloids konnte in einem Teil der Fälle die Dosis nicht weiter erhöht werden, so daß z. B. für die s. c. Toxicität an der Maus nur die höchste noch nicht tödliche Dosis angegeben werden kann ($>$ 200 mg/kg). Eine weitere Erhöhung der Konzentration führt wegen der gleichzeitigen Erhöhung der als Lösungsvermittler benutzten Ascorbinsäure zu Nekrosen. Auf peroralem Wege

war die Ascorbinsäure hingegen weniger störend, so daß hierbei eine Bestimmung der DL 50 möglich war.

Das Vergiftungsbild ist bei allen untersuchten Tierarten unspezifisch. Erregungs- und Krampfzustände, die für Yohimbin und einige seiner Isomeren charakteristisch sind, treten nicht auf. Es kommt lediglich zu einem kollapsartigen Bild mit verminderter Motorik, verlangsamter Atmung, die schließlich in Dyspnoe und Atemlähmung übergeht.

Tabelle 1. *Akut toxische Dosen und Verträglichkeit des Raubasins*

Tierart	Applikat.-Form.	Toxicität	Tierzahl	Beobachtungszeit Std
Maus	i.v.	DL 50 : 20 (17,4—23) mg/kg	60	2
	s.c.	Dos. let. minim.: > 200 mg/kg	20	24
	per os	DL 50 : 500—550 mg/kg	70	2
		DL 50 : 400—450 mg/kg	70	24
Ratte	per os	Dos. let. minim.: 750 mg/kg	10	24
	i.v.	DL 50 : 23,5 (20—26) mg/kg	30	2
Kaninchen	per os	Dos. let. minim.: 500 mg/kg	5	24
	i.v.	DL 50 : 20—30 mg/kg	20	2
Hund	peroral kristallines Gemisch Raubasin-Ascorbinsäure 1 : 10	10 mg/kg ohne Vergiftungssymptome	12	
	i.v.	6 mg/kg: Speichelfluß, Tachykardie	2	

Bei Hunden tritt nach 2—6 mg/kg i. v. regelmäßig Speichelfluß auf. Eine eindeutige sedativ-hypnotische Wirkung fehlt, jedoch findet man eine geringe motorische Inaktivierung mit Schlafneigung.

b) Verträglichkeit bei chronischer Applikation. Raubasin wurde in Dosen von 5, 10, 20, und 40 mg/kg täglich peroral von Ratten über 24 Wochen reaktionslos vertragen. Die Gewichtszunahme und das Blutbild verhielten sich wie bei den mit dem Lösungsmittel behandelten Kontrollgruppen. Der histologische Organbefund ergab keinerlei Anhaltspunkte für eine chronische Intoxikation[1].

2. Adrenergisch blockierende Wirkungen des Raubasins

An zahlreichen Testobjekten werden die Wirkungen des Adrenalins und Nor-Adrenalins durch Raubasin gehemmt oder aufgehoben:

[1] Für die histologische Bearbeitung sind wir Herrn Professor Dr. Sandritter vom Patholog. Institut der Universität Frankfurt a. M. (Direktor: Prof. Dr. E. Lauche) zu Dank verpflichtet.

a) Adrenalinhemmung am isolierten Kaninchenuterus. Am isolierten Kaninchenuterus wird die excitatorische Wirkung von Adrenalin-Konzentrationen $1{,}6 \cdot 10^{-7}$ durch Raubasin stärker gehemmt als durch Yohimbin. Das Wirkungsverhältnis betrug 1:0,56 ($\pm$ 0,25) (Mittelwert aus 14 Versuchen).

Äquivalente Adrenalin- und Nor-Adrenalin-Dosen werden gleich stark beeinflußt. Die Adrenalin-inhibitorische Raubasinwirkung hat eine hohe Spezifität, da die durch Acetylcholin und Bariumchlorid hervorgerufenen und mit Adrenalin äquivalenten Uteruskontraktionen erst durch 80—160mal höhere Raubasindosen abgeschwächt werden.

b) An der isolierten Meerschweinchensamenblase. An der isolierten Meerschweinchensamenblase werden die durch Adrenalinkonzentrationen von $2 \cdot 10^{-6}$ erzeugten Kontraktionen durch Raubasin $5—7 \cdot 10^{-7}$ um 50% herabgesetzt und durch etwa $1 \cdot 10^{-6}$ aufgehoben. Äquivalente Acetylcholin- oder Bariumchlorid-Kontraktionen werden erst durch Raubasinkonzentrationen von 10^{-6} bis 10^{-5} gehemmt.

c) Am Blutdruck der Katze und des Hundes. Über die Beeinflussung der Adrenalin- und Arterenolwirkung durch Raubasin am Blutdruck der *Katze* wurde in einer früheren Arbeit bereits berichtet (Kroneberg u. Achelis).

Um neben diesen qualitativen Aussagen auch quantitative Angaben über die Stärke der adrenalinhemmenden Wirkung machen zu können, haben wir an der Katze in 10 Vergleichsversuchen diejenigen Dosen von Raubasin und Yohimbin aufgesucht, welche eine gerade sichtbare Verminderung einer durch Adrenalin hervorgerufenen Blutdrucksteigerung bewirken. Diese Dosen lagen in 8 Versuchen für Yohimbin je nach der benutzten Adrenalindosis zwischen 30 und 75 γ/kg i.v. und für Raubasin zwischen 100 und 200 γ/kg. Das mittlere Wirkungsverhältnis Yohimbin: Raubasin betrug 1:3,1 ($\pm$ 0,52). Danach ist Yohimbin wirksamer als Raubasin, was auch für die Dauer der Wirkung zutrifft. Analoge Versuche an dekapitierten und atropinisierten Tieren ergaben das gleiche Wirkungsverhältnis. Die Wirkung des Nor-Adrenalins wird erst von etwa 500 γ/kg Raubasin an herabgesetzt.

Am *Hund* führen 250—500 γ/kg Raubasin i.v. zu einer Abschwächung der Adrenalinwirkung, 1—3 mg/kg zur Adrenalinumkehr. Der Abstand zwischen der Wirksamkeit des Yohimbins und der des Raubasins ist am Hund noch größer als an der Katze.

d) Am isolierten Darm. Raubasin hemmt nicht nur die excitatorischen, sondern auch die inhibitorischen Wirkungen des Adrenalins. Bei einer Raubasinkonzentration von $2—4 \cdot 10^{-7}$ wird die Adrenalinwirkung ($4—8 \cdot 10^{-8}$) nahezu aufgehoben. Das Fehlen einer Eigenwirkung, die erst bei wesentlich stärkeren Konzentrationen auftritt, spricht auch hier für einen echten adrenergisch blockierenden Mechanismus.

e) Raubasinwirkungen am isoliert durchströmten Kaninchenohr. Raubasin bewirkte bisweilen schon am *nicht*-tonisierten Gefäßpräparat eine Durchflußvermehrung. Bei der tonisierenden Durchströmung mit

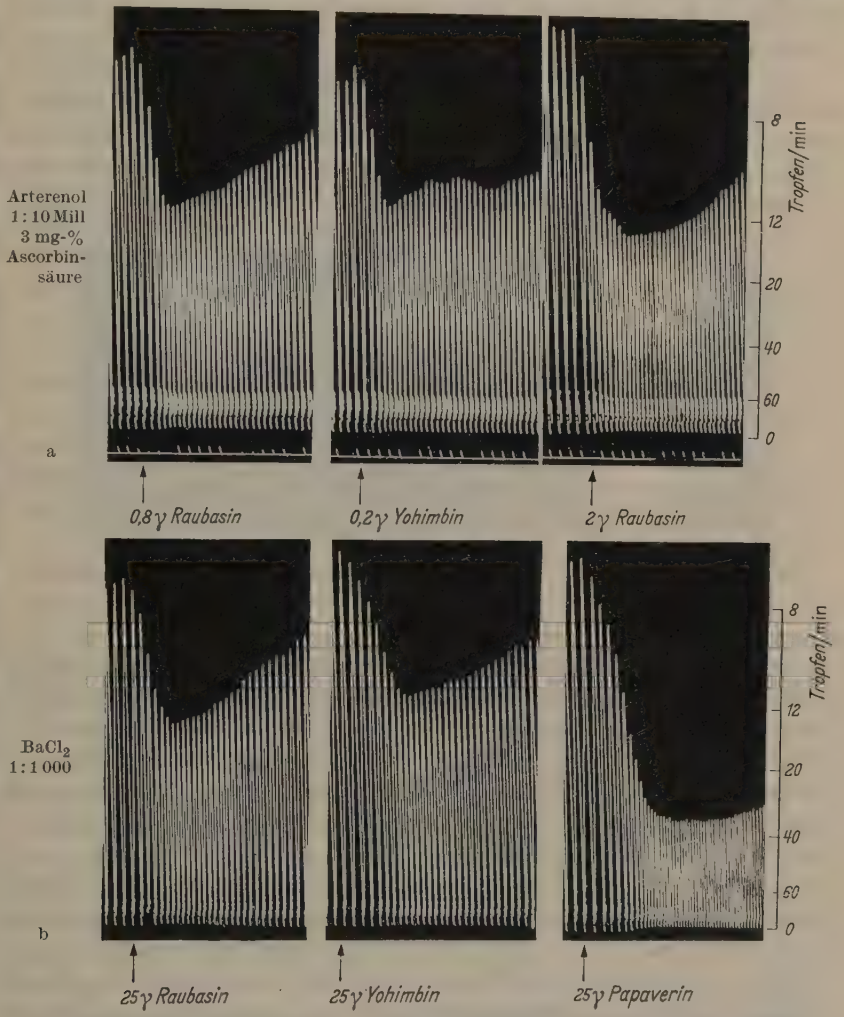


Abb. 1. *Raubasin- und Yohimbinwirkung am isoliert durchströmten Kaninchenohr. Oben:* Tonisierende Perfusion mit Nor-Adrenalin 1:10 Mill. 3 mg-% Ascorbinsäurezusatz zur Tyrodelösung als Oxydationsschutz. *Unten:* $BaCl_2$ 1:1000 in Tyrodelösung. Injektionen der Alkaloide in den Zuführungsschlauch; Injektionsvolumen 0,1 cm^3; Injektionsgeschwindigkeit 3 sec. Registrierung der Tropfgeschwindigkeit mit dem Ordinatenschreiber nach HEUWING-BRAUN

Nor-Adrenalin (10^{-7}) kommt es schon nach geringen Raubasindosen zu einer stärkeren Durchflußsteigerung. In dem in Abb. 1 a dargestellten Versuch sind 0,8 γ Raubasin und 0,2 γ Yohimbin etwa wirkungsgleich. Wie

an anderen Versuchsobjekten, so ist auch hier die Yohimbinwirkung anhaltender als die Wirkung des Raubasins. Mit der 10fachen Raubasindosis erhält man einen deutlich stärkeren Effekt als mit Yohimbin. In 8 weiteren Versuchen schwankte das Wirkungsverhältnis der beiden Alkaloide zwischen 1:4 und 1:8.

Um auch hier die Spezifität der antiadrenergischen Raubasinwirkung zu ermitteln, wurden Versuche mit *$BaCl_2$-Perfusion* durchgeführt. (Abb. 1). Gemessen an der Tropfenzahl je Minute, stimmt das Ausgangsdurchströmungsvolumen mit dem des Arterenolversuches etwa überein.

Von den beiden Alkaloiden sind am $BaCl_2$-tonisierten Präparate nicht 0,8 bzw. 0,2 γ, sondern 25 γ zur Erzeugung gleich starker Durchflußsteigerungen erforderlich. Die muskulär dilatierende Gefäßwirkung von Raubasin und Yohimbin ist also nicht nur um ein Vielfaches schwächer als die antiadrenergische, sondern auch bei beiden Alkaloiden gleich stark ausgeprägt. Sie reicht aber nicht an die Wirksamkeit des *Papaverins* heran.

Tabelle 2. *Hemmung der Adrenalin-Toxicität durch Raubasin an Mäusen* (Gruppen zu je 10 Tieren)

Adrenalin in mg/kg s. c.	Raubasin in mg/kg (30 min vor Adrenalin s. c.)	Letalität %
7,5	—	100
7,5	30	40
7,5	15	60
15,0	30	90

Vergleicht man den Abstand zwischen der muskulär hemmenden und der adrenergisch-blockierenden Dosis, so ergibt sich für Yohimbin ein Verhältnis von 1:125 und für Raubasin von 1:30. Beide Alkaloide zeigen somit auch an isolierten Gefäßen eine ausgeprägte antiadrenergische Spezifität, die beim Yohimbin mehrfach größer als beim Raubasin ist. Die durch *Angiotonin* erzeugte Durchflußminderung läßt sich ebenfalls durch Raubasin herabsetzen. Ähnlich wie beim $BaCl_2$ liegen aber die hierfür notwendigen Dosen erheblich über den adrenergisch-blockierenden.

Zu ähnlichen Ergebnissen führten Versuche, in denen das Gefäßpräparat nicht tonisiert, sondern mit Raubasin- oder Yohimbinlösung durchströmt wurde und die Kontraktionssubstanzen in den Zuführungsschlauch injiziert wurden. Adrenalin und Nor-Adrenalin wurden durch vielfach geringere Raubasinkonzentrationen abgeschwächt als Angiotonin.

f) Die Hemmung toxischer Adrenalinwirkungen durch Raubasin. Die Toxicität des Adrenalins wird wie durch andere adrenergisch-blokkierende Substanzen auch durch prophylaktische Raubasingaben herabgesetzt. In Tab. 2 sind Versuchsergebnisse zusammengestellt, aus denen die verminderte Toxicität einer letalen Adrenalin-Dosis nach 30 bzw. 15 mg/kg Raubasin hervorgeht.

3. Raubasinwirkungen an glattmuskeligen Organen

Einige Rauwolfia-Alkaloide besitzen erregende Wirkungen auf den Magen-Darm-Traktus und den Uterus. Hierüber liegen schon aus der älteren Rauwolfia-Literatur mehrere Hinweise vor (CHOPRA, GUPTA u. MUKHERJEE; CHOPRA u. CHAKRAVARTI), ohne daß der Mechanismus der Excitation geklärt werden konnte.

a) Raubasinwirkungen am isolierten Darm. Am isolierten Kaninchenileum kommt es bei Raubasinkonzentrationen von $4 \cdot 10^{-6}$ bis $2 \cdot 10^{-5}$ zu einer Hemmung der Pendelbewegungen; am *isolierten Meerschweinchencolon* blieben in den meisten Versuchen Tonus- und Spontanmotilität

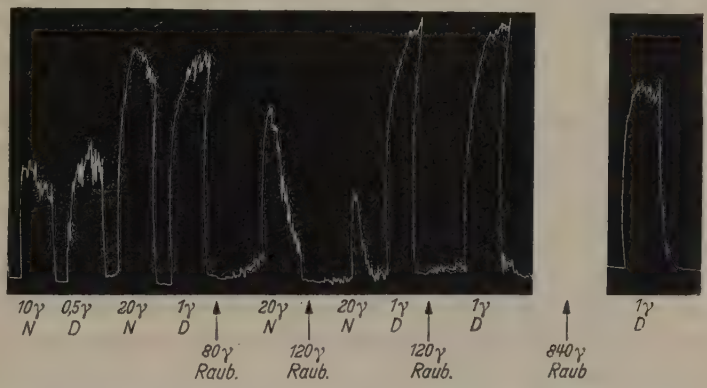


Abb. 2. *Nicotinhemmende Wirkung von Raubasin am isolierten Meerschweinchencolon.* Tyrodebad 38° C, 25 cm³ Badinhalt. *N* Nicotin (Base) *D* Doryl, *Raub.* Raubasin. Vor jeder Raubasin-Dosis wurde die Tyrode-Lösung erneuert. Äquivalent sind 20 γ Nicotin und 1 γ Doryl. Die Nicotinwirkung wird durch 80 γ Raubasin stärker gehemmt als Doryl durch die 10fache Raubasindosis

bis zu Konzentrationen von 10^{-5} unbeeinflußt, in anderen kam es schon nach kleineren Dosen zu Tonusabfall und Verminderung der Motilität.

Am *Meerschweinchendickdarm* besteht außerdem eine *unterschiedliche Spezifität* gegenüber der *Nicotin-*, *Acetylcholin-* und *Histaminwirkung* (Abb. 2). Wirkungsäquivalent waren in diesem Versuch 20 γ Nicotin und 1 γ Doryl. Läßt man 80 γ Raubasin 2 min auf das Darmstück einwirken und gibt darauf 20 γ Nicotin hinzu, so ist dessen Wirkung abgeschwächt und nach Erhöhung der Raubasindosis auf 120 γ nahezu aufgehoben. Die gleiche Raubasindosis ist gegenüber Doryl völlig wirkungslos. Erst die 7—8fache Menge setzt auch dessen Wirkung etwas herab. Die histaminhemmenden Dosen liegen meistens noch höher. Yohimbin hat eine stärkere Antinicotinwirkung als Raubasin (KRONEBERG 1954).

b) Raubasinwirkungen am Darm in situ. Im Gegensatz zum isolierten Darm reagiert der Darm in situ nach intravenöser Raubasininjektion mit Erregung. Am Jejunum und Ileum der Katze (10 Versuche) sowie am Kaninchenileum (6 Versuche) kommt es kurz nach der Applikation von

100—500 γ/kg zu Motilitäts- und Tonussteigerungen, die nach einigen Minuten abklingen. Vagusdurchschneidung hatte keinen Einfluß, dagegen hob Atropin in höheren Dosen die Wirkung auf. Vergleichsversuche mit äquivalenten Doryldosen zeigten aber, daß die vom Doryl erzeugte Darmstimulierung wesentlich atropinempfindlicher ist als die Raubasinwirkung, was gegen einen vorwiegend muscarinartigen Wirkungsmechanismus spricht. Durch Atropindosen, welche die Raubasinwirkung aufhoben, wurde auch die Spontantätigkeit des Darmes paralysiert, der Tonus herabgesetzt und die Erregungswirkung von intravenösem $BaCl_2$ aufgehoben, so daß es fraglich ist, ob die Hemmung durch Atropin für eine spezifisch parasympathische Raubasinwirkung spricht.

Auch Yohimbin und Serpentin haben eine darmerregende Wirkung. Serpentin ist mehrfach stärker, Yohimbin etwas schwächer wirksam als Raubasin.

c) Raubasinwirkungen am isolierten Kaninchenuterus. Neben der spezifischen Hemmung der excitatorischen Adrenalinwirkung hat Raubasin in hohen Dosen eine erregende Eigenwirkung auf den isolierten Kaninchenuterus. Der wirksame Konzentrationsbereich beginnt zwischen $2—4 \cdot 10^{-5}$, d. h. etwa zwei Zehnerpotenzen über den antiadrenergischen Konzentrationen. Serpentin ist, wie am Darm, so auch am Uterus wirksamer als Raubasin. Nach Atropin bleibt die Wirkung bestehen, während äquivalente Dorylwirkungen aufgehoben werden.

4. Stoffwechsel-, Temperatur- und Blutzuckerwirkungen des Raubasins

Raubasin hat am Kaninchen in Dosen bis zu 60 mg/kg s. c. keine Wirkung auf den Blutzucker. Die durch 0,1 mg/kg Adrenalin s. c. verursachte Hyperglykämie wird nicht gehemmt.

Der O_2-Verbrauch und die Motilität von Mäusen bleiben durch Raubasindosen bis zu 25 mg/kg s. c. unbeeinflußt.

Am Kaninchen blieb die Rectaltemperatur unter Raubasindosen von 10—40 mg/kg s. c. konstant, was zur Abgrenzung gegen die ebenfalls adrenergisch wirkenden Secale-Alkaloide Ergotamin und Ergotoxin von Bedeutung sein dürfte, die eine temperaturerhöhende Wirkung besitzen (Rothlin 1935).

5. Kreislaufwirkungen des Raubasins

Raubasin hat an allen gebräuchlichen Laboratiumstieren (Hund, Katze, Kaninchen, Ratten und Meerschweinchen) eine mehr oder weniger stark ausgeprägte blutdrucksenkende Wirkung. Das Ausmaß der Blutdrucksenkung ist von dem Zustand des Versuchstieres, der Tiefe der Narkose und der Dosierung abhängig. Verhältnismäßig empfindlich sind Ratten und Katzen, die schon auf 200 bis 500 γ/kg i.v. ansprechen, während bei Hunden Dosen von 2—4 mg/kg für

länger anhaltende Drucksenkungen erforderlich sind. Nach kleineren Dosen (0,25—1 mg/kg) kommt es am Hund unter Erhöhung der peripheren Durchblutung nur zu geringen Blutdruckveränderungen.

a) Raubasinwirkungen auf Blutdruck und Extremitätendurchblutung des narkotisierten Hundes. In dem in Abb. 3 wiedergegebenen Beispiel von 15 Versuchen ist eine für den Hund typische Reaktion nach 1 mg/kg Raubasin i.v. dargestellt. Nach flüchtigem Abfall des systolischen und diastolischen Druckes setzt eine Erhöhung der Herzfrequenz ein, wenig später wird das Durchströmungsvolumen der Hinterextremität auf nahezu das Doppelte vermehrt. Gleichzeitig sinkt auch der Venendruck ab. Die Durchblutungszunahme liegt 7 min später noch deutlich über dem Ausgangswert. Die Erklärung für den trotz Gefäßerweiterung konstant bleibenden Mitteldruck kann nur darin gesehen werden, daß die in dem gesteigerten peripheren Strömungsvolumen zum Ausdruck kommende Gefäßerweiterung durch ein erhöhtes Herzminutenvolumen kompensiert wird.

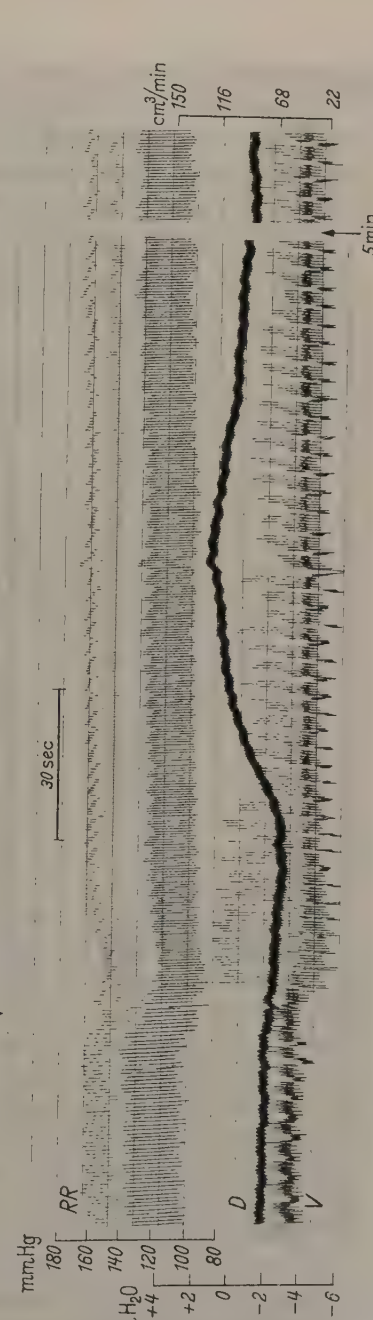


Abb. 3. *Raubasinwirkung auf Blutdruck, Herzfrequenz, Durchströmungsvolumen und Venendruck des Hundes. Hund* 10 kg, Morphin-Chloralose-Narkose, Heparin 1000 E/kg i.v. *RR* Druck in der A. femoralis dextr. *D* Durchströmungsvolumen der A. femoralis sin. (Rotameter). *V* zentraler Venendruck (Vena cava in Zwerchfellhöhe). (Aus gemeinsamen Versuchen mit K. Graf und W. Overbeck am Physiolog. Institut der Univ. Marburg [Prof. Dr. Kramer]; siehe auch Kronberg, Graf und Overbeck, Tagung d. Dtsch. Pharmakolog. Ges., Graz, 1955.)

b) Kreislaufanalyse am wachen Carotisschlingenhund. In 8 Versuchen am Carotisschlingenhund nach Wetzler-Böger ergab sich eine prinzipielle Übereinstimmung mit den Ergebnissen am narkotisierten Tier. Wie aus dem Versuchsbeispiel in Abb. 4 hervorgeht, kommt es nach 2 mg/kg Raubasin i.v. zu einem vorübergehenden Absinken des systolischen und diastolischen Druckes und des peripheren Gefäßwiderstandes. Der Mitteldruck kann wegen des zunächst abgesunkenen Schlagvolumens offenbar nicht auf der ursprünglichen Höhe gehalten werden, weil die Frequenzzunahme zur Erzielung eines ausreichenden Minutenvolumens

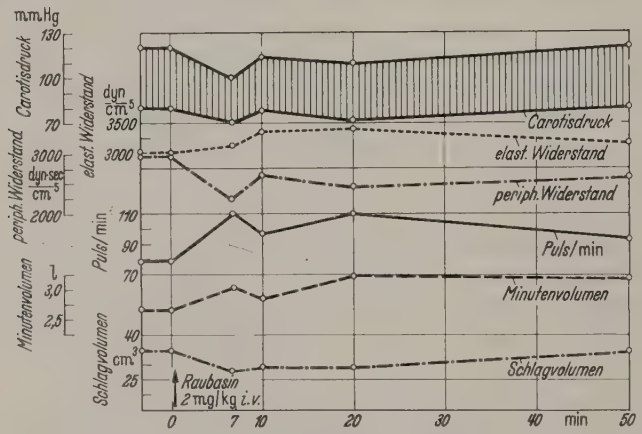


Abb. 4. *Kreislaufanalyse am nicht narkotisierten Carotisschlingenhund nach Wezler-Boeger. Hund* Rex, 31 kg, 2 mg/kg Raubasin i.v.

zu gering ist. Erst nach Durchschreitung einer kurzen gegenregulatorischen Phase mit Wiederanstieg des systolischen und diastolischen Druckes wird eine stabilere Kreislaufeinstellung erreicht. 50 min nach der Injektion sind Herzfrequenz und Minutenvolumen noch erhöht und der periphere Widerstand erniedrigt. Der Blutdruck ist wieder normal.

Nach diesen Ergebnissen ist Raubasin *am Hund* weniger ein blutdrucksenkendes Pharmakon als vielmehr ein Mittel zur Steigerung der peripheren Durchblutung. Die von dem Alkaloid ausgelösten Wirkungen sind die Reaktionen eines regulierfähigen Kreislaufs auf periphere Gefäßerweiterungen, der diese — solange sie sich in physiologischen Grenzen halten — nicht mit einer Blutdrucksenkung, sondern mit einer Steigerung des Herzminutenvolumens beantwortet.

c) EKG-Veränderungen nach Raubasin. Das EKG der Katze wird nach i. v. Dosen bis zu 1 mg/kg Raubasin nicht verändert. Es tritt lediglich eine Beschleunigung der Herzfrequenz auf. Nach 2—3 mg/kg kommt es zu Sinus-Bradykardie, Verlängerung von PQ und bei noch höheren Dosen auch zu einer Verlangsamung der Erregungsausbreitung im Ventrikel.

Zu gleichen Ergebnissen sind kürzlich Göing u. Kempe an Meerschweinchen gekommen. Stärkere Abnormitäten der Erregungsbildung und -leitung wurden selbst bei hoher Dosierung (5—10 mg/kg i.v.) nicht beobachtet. Infolge des bei diesen Dosen auf Kollapswerte absinkenden Blutdruckes kommt es zu ausgeprägten Symptomen einer verminderten Herzdurchblutung (ST-Senkung, T negativ).

6. Ursachen der Kreislaufwirkung

a) Angiotoninwirkung und Raubasin am Katzenblutdruck. Zur Klärung der Frage, wieweit die am isolierten Gefäßpräparat nachgewiesene muskulär-dilatatorische Wirkung am intakten Tier von Bedeutung ist, wurde die Beeinflussung der Angiotoninwirkung am Katzenblutdruck untersucht[1]. Während 2 mg/kg Raubasin i.v. die Nor-Adrenalinwirkung stark abschwächen und eine „Umkehr" der Adrenalinwirkung auslösen, läßt sich die Wirkung des Angiotonins erst durch eine zusätzliche Dosis von 4 mg/kg Raubasin etwas hemmen.

Nach diesem Ergebnis ist anzunehmen, daß an der Kreislaufwirkung bei Dosen über 2 mg/kg neben der intensiveren antiadrenergischen Wirkung ein direkter Angriff an der Gefäßmuskulatur beteiligt ist.

b) Blutdruckwirkung von Raubasin nach Vagotomie, Atropin und Dekapitation. An der Katze wird die blutdrucksenkende Raubasinwirkung durch Vagotomie oder Atropin nicht beeinflußt. Nach Dekapitierung wirkt Raubasin ebenfalls depressorisch; wenn der Druck jedoch auf 50—40 mm Hg abgesunken ist, sind Dosen bis zu 2 mg/kg i.v. wirkungslos. Ein Blutdruckanstieg, wie ihn Rothlin bei verschiedenen Mutterkornalkaloiden beschrieben hat, war nicht nachzuweisen. Wird der Blutdruck durch Dauerinfusion von Nor-Adrenalin oder Adrenalin erhöht, kommt es nach i.v. Raubasindosen von 0,5—2 mg/kg zu einer etwa 5—10 min anhaltenden Blutdrucksenkung. Äquivalente Infusionen von Angiotonin werden erst durch 3—4 mg/kg Raubasin beeinflußt.

c) Wirkung auf den Carotissinus. In früheren Untersuchungen hatten wir die Verminderung des pressorischen Carotissinus-Entlastungseffektes durch Raubasin am Katzenblutdruck wegen der gleichstarken Hemmung äquivalenter Nor-Adrenalindosen auf die adrenergisch-blockierende Wirkung zurückgeführt (Kroneberg u. Achelis). Wie sich in weiteren Versuchen mit dem genauer registrierenden Broemserschen Glasplattenmanometer herausstellte, ist aber nach kleineren Raubasindosen (250 bis 500 γ/kg) der Verlauf des Druckanstieges während der Carotissinus-Entlastung bei einem Teil der Tiere schon verändert, während die Arterenolwirkung noch völlig unbeeinflußt ist. Die Veränderung besteht in einem nur zögernden Anstieg des systolischen und vor allem des

[1] Für die Überlassung von Angiotonin sind wir Herrn Dr. O. Helmer von der Eli Lilly & Co., Indianapolis, sehr zu Dank verpflichtet.

diastolischen Druckes, die erst 20—30 sec nach der Gefäßabklemmung die Höhe der Arterenolreaktion erreichen. Häufig bleibt der diastolische Druck erniedrigt. Man muß daraus schließen, daß der blutdrucksteigernde „Reflex" auch auf anderem Wege als über die periphere adrenergische Innervation beeinträchtigt wird (Abb. 5).

Vergleichsinjektionen in die A. carotis und die V. jugularis ergaben keinerlei Anhaltspunkte für eine *unmittelbare Raubasinwirkung* auf die Carotissinus-Baroreceptoren. Auch nach *Denervierung* beider Sinus ist

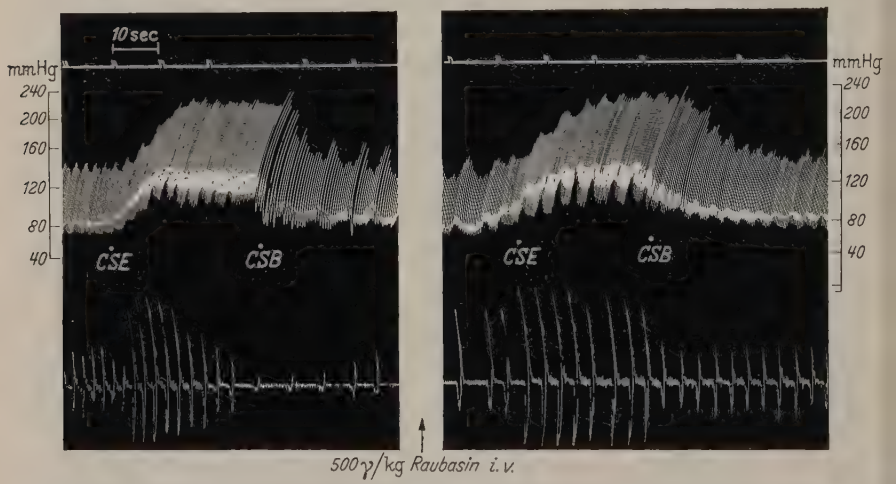


Abb. 5. *Beeinflussung der Carotissinusentlastungs- und -belastungsreaktion am Blutdruck des Hundes durch Raubasin. Hund* 21 kg, Morphin-Chloralose-Narkose. Blutdruckregistrierung mit dem Broemserschen Glasplattenmanometer in der A. femoralis. *Oben:* Blutdruck, *unten:* Atmung. *CSE:* Carotissinusentlastung. *CSB:* Carotissinusbelastung. Nach 500 γ/kg Raubasin setzt die Entlastungsreaktion verzögert ein. Bei Wiederbelastung keine Vaguspulse, nur mäßige Bradykardie und kein Atemstillstand

die Raubasinwirkung am Blutdruck erhalten, allerdings fehlt beim Hund die Steigerung der Herzfrequenz.

Nach dem Abklemmen der Carotiden reagiert das Tier vor der Raubasininjektion unter Zunahme der Herzfrequenz mit einem steilen Anstieg des systolischen und diastolischen Druckes. Die Abnahme der Klemmen führt infolge der starken Reizung der Baroreceptoren durch den in diesem Moment erhöhten Druck zu ausgeprägten Vaguspulsen, anhaltender Bradykardie und einem Rückgang des Druckes zum Ausgangsniveau. Gleichzeitig ist die Atmung vorübergehend aufgehoben (siehe Abb. 5). Nach 500 γ/kg Raubasin i.v. hat der Blutdruck zum Zeitpunkt der Wiederbelastung des Carotissinus die gleiche Höhe wie vorher erreicht, so daß bei Entfernung der Klemmen derselbe Druck auf die Baroreceptoren trifft. Trotzdem kommt es nur zu geringer Bradykardie ohne Vaguspulse und nicht zu Atemstillstand. Die nächstliegende Erklärung, die veränderte Belastungsreaktion sei die Folge einer

anticholinergischen Wirkung des Raubasins, entfällt, da das Alkaloid weder die Acetylcholinwirkung, noch die periphere Vagusreizung am Blutdruck vermindert. Auch eine direkte Wirkung auf den Carotissinus kommt aus den bereits zitierten Gründen nicht in Betracht.

Verständlicher würde die Beobachtung, wenn man eine *zentrale Raubasinwirkung* annimmt, denn mit einer Herabsetzung des zentralen Vasoconstrictorentonus müßte eine verringerte Wandspannung des Carotissinus einhergehen, die nach HEYMANS zu einer Reizschwellenerhöhung der Baroreceptoren führt. Durch die Erhöhung der Reizschwelle würde der Druckanstieg eine geringere Receptorenreizung und damit eine schwächere Vagusreaktion auslösen.

Der herabgesetzte Vasoconstrictorentonus würde weiterhin den verzögerten, in Abb. 5 ebenfalls erkennbaren Druckanstieg erklären. Die verminderte Erregbarkeit der constrictorischen Zentren wirkt sich offenbar primär in einer verlangsamten und erst bei stärkerer Hemmung auch in einer verringerten Maximalhöhe der Blutdruckreaktion aus.

Tabelle 3. *Die Beeinflussung der Amphetamin- und Adrenalintoxicität durch Raubasin und Yohimbin an der Maus*

Injektionen s.c. Raubasin und Yohimbin wurden 10 min vor den Sympathicomimeticis injiziert. Zahlen = DL 50, die Werte in Klammern geben den Wahrscheinlichkeitsbereich für 95% der möglichen Fälle an

	DL 50 mg/kg	Tierzahl	Ablesung n/Std
Amphetamin	2,8 (2,17—3,9)	50	5
Amphetamin + 10 mg/kg Raubasin . .	4,9 (4,0 —6,0)	70	5
Amphetamin + 10 mg/kg Yohimbin . .	1,2 (0,9 —1,4)	90	5
Adrenalin	3,05 (2,7 —3,45)	60	2
Adrenalin + 10 mg/kg Raubasin . . .	2,75 (2,3 —3,3)	60	2
Adrenalin + 10 mg/kg Yohimbin . . .	3,1 (2,06—3,62)	60	2

7. Zentrale Wirkungen des Raubasins

Außer der Wirkung auf die *vasomotorischen* Zentren haben sich noch andere zentrale Raubasinwirkungen nachweisen lassen.

a) Hemmung der Amphetamintoxicität. Wie aus Tab. 3 zu ersehen ist wird die DL 50 des Amphetamins durch vorherige Verabfolgung von 10 mg/kg Raubasin signifikant erhöht. Demgegenüber wird die Toxicität des *Adrenalins* durch die gleiche Raubasindosis nicht signifikant beeinflußt. Wie bereits gezeigt wurde (siehe 2,f), sind zur Hemmung der

Adrenalintoxicität höhere Raubasindosen erforderlich. Die Giftigkeit des vorwiegend *zentral angreifenden Amphetamins* läßt sich demnach durch kleinere Raubasindosen herabsetzen als die des vorwiegend *peripher wirkenden Adrenalins*.

Im Gegensatz zum Raubasin führt *Yohimbin* in gleicher Dosis zu einer Erhöhung der Amphetamintoxicität (Tab. 3). Die Toxicität des *Adrenalins* wird durch Yohimbin nicht verändert.

Da Yohimbin im Unterschied zu Raubasin bereits eine excitierende Eigenwirkung hat, scheint der Toxicitätsanstieg durch eine Steigerung der an sich schon extremen Amphetaminerregung bedingt zu sein. Dies zeigte sich auch in dem über die Amphetaminwirkung hinausgehenden exzessiven Erregungszustand der Versuchstiere. Offenbar spielt die antiadrenergische Wirksamkeit bei diesen zentralen Wirkungen keine Rolle, da beide Alkaloide dann nicht nur in gleicher Richtung, sondern Yohimbin auch stärker wirken müßte. *Die Ergebnisse sprechen vielmehr für eine beim Yohimbin nicht vorhandene zentrale Hemmwirkung des Raubasins.*

b) Hemmung der Yohimbinkrämpfe. Der Unterschied zwischen den zentralen Wirkungen des Yohimbins und Raubasins wird durch den Nachweis, daß sich die Yohimbinkrämpfe durch Raubasin vermindern lassen, besonders augenfällig (Tab. 4).

Tabelle 4. *Hemmung der Yohimbin-Krämpfe an der Maus durch Raubasin*
Mittlere Krampfdosis des Yohimbins (60 min Ablesezeit) in mg/kg. — Raubasin 10 min vor Yohimbin s.c.

Substanz	mittlere Yohimbin-krampfdosis in mg/kg	Tierzahl
Yohimbin s. c.	14 (11,7—16,8)	60
Yohimbin s. c. + 25 mg/kg Raubasin	22,5 (14,6—31)	50
Yohimbin s. c. + 50 mg/kg Raubasin	40,5 (37,5—44)	60
Yohimbin s. c. + 100 mg/kg Raubasin	58 (52 —65)	60

Die mittlere Krampfdosis des Yohimbins beträgt 14 mg/kg s.c. Nach vorheriger Gabe von 25 mg/kg Raubasin ist sie auf 22,5 mg/kg erhöht, nach 50 und 100 mg/kg auf 40,5 bzw. 58 mg/kg. Die Werte gelten allerdings nur für die ersten 60 min nach der Injektion. Im Verlaufe der nächsten 2—3 Std bricht die Yohimbinwirkung infolge des schnelleren Abklingens der Raubasinwirkung wieder durch, so daß die mittlere Krampfdosis absinkt. *Raubasin* erweist sich somit unter bestimmten experimentellen Bedingungen sogar als *Antagonist* des *Yohimbins*.

c) Antiemetische Wirkung. Die in Tab. 5 u. 6 zusammengestellten Ergebnisse zeigen, daß Raubasin verschiedene Formen des pharmakologischen Erbrechens am Hund herabsetzt. Angesichts der zentralen bzw. reflektorischen Genese des Erbrechens scheint hierin eine weitere zentrale Wirkung des Raubasins zum Ausdruck zu kommen.

α) Veratrin-Erbrechen. Wegen der starken Atmungs- und Kreislaufwirkungen großer Veratrindosen wurde das Erbrechen durch wiederholte i.v. Injektionen kleiner Dosen hervorgerufen. Bei gleichzeitiger Injektion von Raubasin konnte in der überwiegenden Zahl der Fälle trotz Verdoppelung der Veratrin-Injektionen kein Erbrechen erzielt werden (Tab. 5). Die Injektionen mußten wegen des drohenden Kollapses abgebrochen werden. Offenbar besteht eine Abhängigkeit von der Höhe der Raubasindosis, denn in 2 Fällen, wo 1 mg/kg Raubasin nur wenig wirkte, ließ sich mit der doppelten Dosis ein stärkerer Effekt erzielen. Ein Hund (Nr. 6) reagierte nicht auf Raubasin.

Tabelle 5. *Beeinflussung des Veratrinerbrechens durch Raubasin am Hund.* In Abständen von 10 min wurden 5 γ/kg Veratrumalkaloide (Unitensen) i.v. verabfolgt. Die Werte geben die Anzahl der Injektionen bis zum Erbrechen an. Raubasin wurde gleichzeitig mit den Veratrumalkaloiden injiziert

Hund Nr.	Veratrumalkaloide	Veratrumalkaloide + 1 mg/kg Raubasin	Veratrumalkaloide + 2 mg/kg Raubasin
1	9	>19	>18
2	7	>15	>15
3	7	>13	>16
4	4	8	>12
5	13	>19	>20
6	13	11	12
7	9	12	>15

β) Apomorphin-Erbrechen. Das nach 0,1 mg/kg Apomorphin s. c. einsetzende Erbrechen wird durch i. v. Injektionen von 1—2 mg/kg Raubasin sofort aufgehoben. Wenn die Injektionen in Abständen von 10 min 2—3 mal wiederholt wurden, unterblieben die Brechreaktionen auch in der Folgezeit vollständig. Bei prophylaktischer *peroraler* Applikation von Raubasin läßt sich die Apomorphinwirkung ebenfalls vermindern. Bereits 5 mg/kg Raubasin sind deutlich wirksam, während 10 mg/kg zu einer Reduzierung der Brechakte auf ¼ führen. Das zum Vergleich herangezogene Diphenhydramin (Chen), das in der Therapie der Seekrankheit benutzt wird, wirkt in der doppelten Dosis (20 mg/kg) noch etwas schwächer (Tab. 6).

γ) Strophantin-Erbrechen. Besonders ausgeprägt war die antiemetische Raubasinwirkung beim Strophanthin-Erbrechen (Tab. 6). 2,5 mg/kg g-Strophanthin führten bei allen Tieren 1—2 Std nach der peroralen Applikation zu Erbrechen. Wurden gleichzeitig 10 mg/kg Raubasin verabfolgt, d. h. eine Dosis, die das Apomorphin-Erbrechen noch nicht vollständig aufhebt, so sank die Zahl der Brechakte von 11,3 auf 0,6 herab. 6 von 7 Hunden hatten kein Erbrechen mehr, bei 1 Tier war die Anzahl der Brechakte von 8 auf 4 reduziert.

Busse u. Lendle hatten in ihren Untersuchungen über die Beeinflussung des Digitalis-Erbrechens keine eindeutigen Beziehungen zwischen der Hemmung der Bradykardie und der Hemmung des Erbrechens feststellen können und zwei verschiedene Entstehungsmechanismen angenommen. So konnte z. B. mit Nicotin, Novocain und Pendiomid die Bradykardie aufgehoben werden oder in eine Tachykardie übergehen, ohne daß das Erbrechen wesentlich vermindert wurde. Demgegenüber hatte Tetraäthylammonium eine gute antiemetische Wirkung, ohne die Bradykardie zu beeinflussen.

In unseren Versuchen mit 2,5 mg/kg g-Strophanthin reagierten 4 von 7 Tieren mit einer deutlichen Bradykardie, die 2—3 Std nach der Applikation des Strophanthins ihren Tiefpunkt erreichte. Das Ausmaß der Frequenzverlangsamung stand in

Tabelle 6. *Hemmung des Apomorphin- und Strophanthin-Erbrechens durch Raubasin und Diphenhydramin am Hund*

Zahlen = Anzahl der Brechakte (Mittelwerte mit mittl. Fehler) Apomorphin-Injektionen s.c. (0,1 mg/kg); g-Strophanthin 2,5 mg/kg per os. Das Raubasin-Ascorbinsäuregemisch und Diphenhydramin wurden 30 min vor Apomorphin, Raubasin und g-Strophanthin wurden gleichzeitig peroral verabfolgt

Substanz	Anzahl der Brechakte	Tierzahl
Apomorphin s.c.	14,8 (± 5,4)	6
Apomorphin s.c. + 5 mg/kg Raubasin p. o.	8,2 (± 1,6)	6
Apomorphin s.c. + 10 mg/kg Raubasin p. o.	3,7 (± 1,0)	6
Apomorphin s.c. + 20 mg/kg Diphenhydramin	5,7 (± 2,4)	6
g-Strophanthin p. o.	11,3 (± 1,3)	7
g-Strophanthin p. o. + 10 mg/kg Raubasin p. o.	0,6	7

keinem Zusammenhang mit der Zahl der Brechakte. Wurden die gleichen Tiere 5 Tage später mit der Kombination Strophanthin + Raubasin behandelt, so kam es bei 6 von 7 Tieren zu einem Anstieg der Herzfrequenz. In einem Fall, wo das Erbrechen nur partiell gehemmt wurde, war der bradykardische Strophanthin-Effekt unverändert vorhanden. Raubasin verhält sich also insofern anders als die von Busse u. Lendle untersuchten Substanzen, als die Aufhebung der emetischen Strophanthinwirkung mit einer Hemmung seiner bradykardischen Wirkung parallel geht. Es ist aber zweifelhaft, ob hier überhaupt eine „Hemmung" vorliegt, da die Bradykardie nicht nur aufgehoben wird, sondern in eine Tachykardie umschlägt. Außerdem wurde die Herzfrequenz auch derjenigen Tiere gesteigert, die im Kontrollversuch mit Strophanthin allein keine Bradykardie bekommen hatten. Da Raubasin an sich in einer Dosis von 10 mg/kg peroral am Hund eine Tachykardie erzeugt, ist es wahrscheinlicher, daß die bradykardische Strophanthinwirkung durch die tachykardische des Raubasins nur überdeckt wird, so daß zwar ein formaler, aber kein ursächlicher Antagonismus vorliegt. Die frequenzsteigernde Wirkung des Raubasins wäre dann trotz ihrer Parallelität mit der antiemetischen Wirkung nicht anders zu bewerten als die Frequenzwirkung der von Busse u. Lendle untersuchten Stoffe, denen eine antiemetische Wirksamkeit fehlt.

Das Bestehen einer vagal-ganglionären oder peripher-anticholinergischen Wirkung des Raubasins, die als Ursache für die frequenzsteigernde und antiemetische Wirkung in Betracht käme, konnte in Vagusreizversuchen am Katzen- und Hundeblutdruck im Vergleich mit äquivalenten Acetylcholindosen ausgeschlossen werden.

d) Die Wirkung von Raubasin auf spinale Reflexe. An decerebrierten Katzen reduzieren schon 400 γ/kg Raubasin i. v. den homolateralen

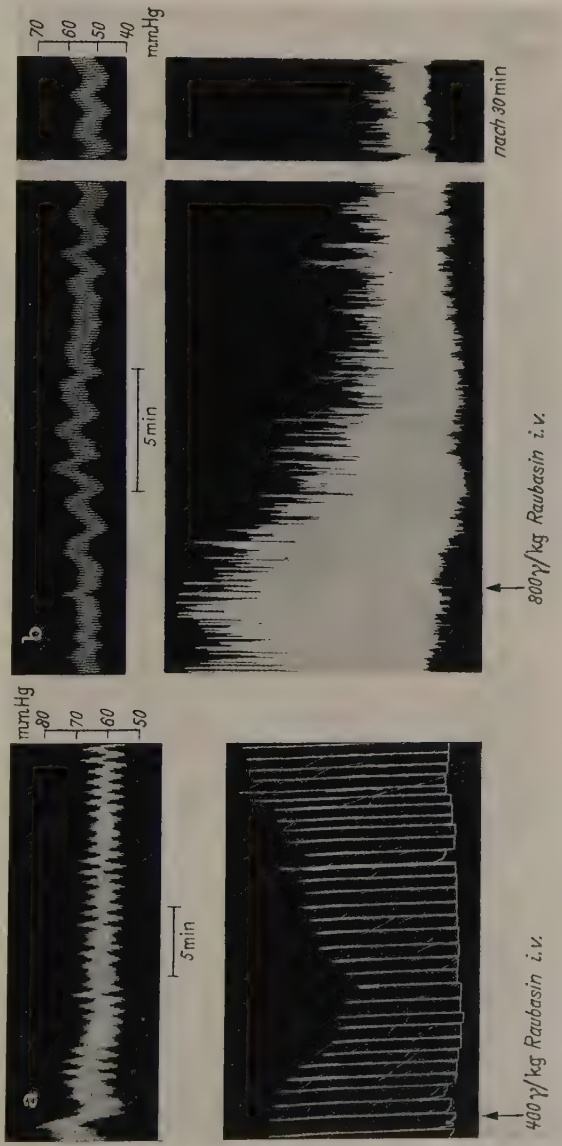


Abb. 6. *Raubasinwirkung auf den homolateralen Beugereflex und den Patellarreflex der Katze.* a *Katze* 2,1 kg, decerebriert nach SHERRINGTON. *Oben:* Blutdruck aus der A. carotis sin. *Unten:* homolateraler Beugereflex links. — N. femoralis u. N. obturatorius sin. durchschnitten Rückenmark bei Th 11 durchschnitten. Reizung des afferenten Peronaeusstumpfes. 30 Hz, 2 Milliamp., 1 msec, Reizdauer 0,5 sec. b *Katze* 2,7 kg, decerebriert nach SHERRINGTON. *Oben:* Blutdruck i. d. A. carotis. *Unten:* Patellarreflex. N. ischiadicus u. obturatorius durchschnitten. Reflexauslösung jede Sekunde mit einem Reflexhammer nach WRIGHT u. SCHWEITZER

Beugereflex und den Patellarsehnenreflex 10—20 min lang (Abb. 6). Beide Reflexe werden gleichzeitig und durch dieselben Grenzdosen beeinflußt. Höhere Dosen (1—2 mg/kg) setzen die Reflexansprechbarkeit

über Stunden und teilweise irreversibel herab. Die Hemmung läßt sich mit Strychnin durchbrechen. Umgekehrt wird die reflexsteigernde Strychnin- oder Nicotinwirkung durch Raubasin herabgesetzt. Versuche mit gleichzeitiger Registrierung von Blutdruck und Rückenmarksreflexen ergaben, daß Raubasin-Dosen, die bereits eine längere Hemmung der Reflexe hervorrufen, nur eine flüchtige Abschwächung der Adrenalin- oder Nor-Adrenalinwirkung am Blutdruck verursachen, so daß in zeitlicher Hinsicht keine Parallelität der beiden Wirkungen besteht.

8. Nicotin-hemmende Wirkung des Raubasins

Da Raubasin weder curareartige noch stärkere lokalanaesthetische Wirkungen besitzt, dürfte seine Wirkung auf die spinalen Reflexe auf einer Herabsetzung der Erregbarkeit in den Schaltganglienzellen des

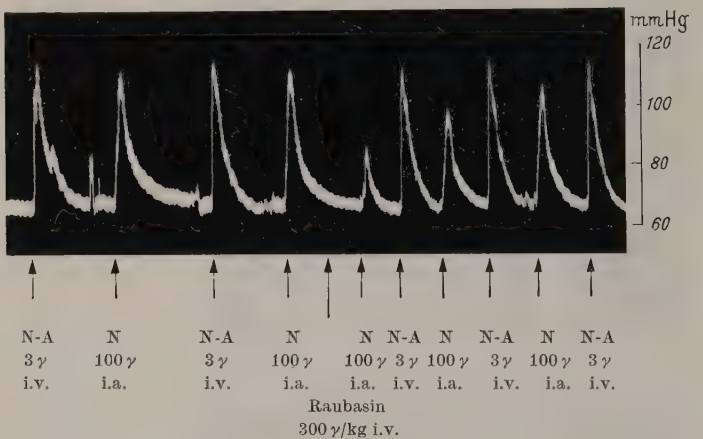


Abb. 7. *Hemmung der durch Nicotin erzeugten Blutdrucksteigerung an der decerebrierten und adrenalektomierten Katze durch Raubasin. Katze* 2,4 kg, decerebriert nach Sherrington, künstl. Atmung, beiderseits adrenalektomiert, Blutdruckregistrierung mit Hg-Manometer aus der A. carotis dextr. Intraarterielle (i.a.) Injektionen in die Aorta abd. via A. mesenterica sup.; i.v. Injektionen in die V. jugularis dextr. Vor Raubasin haben Nicotin (N) und Nor-Adrenalin (Nor-Adr.) die gleiche Wirkung, nach Raubasin ist Nicotin schwächer als Nor-Adrenalin. Langsame Rückkehr der Nicotinwirkung

Rückenmarks beruhen. Die Verminderung der Erregbarkeit scheint sich nicht allein auf cerebrospinale Ganglienzellen zu beschränken, sondern läßt sich auch an vegetativen Ganglien nachweisen.

Injiziert man *Nicotin* an der decerebrierten und adrenalektomierten Katze direkt in die Aorta (siehe Methodik), so erhält man mit Dosen, die i.v. nur eine geringe blutdrucksteigernde Wirkung haben, stärkere Anstiege des Blutdruckes (Abb. 7). Bekanntlich ruft Nicotin eine intensive Verengerung der Splanchnicusgefäße hervor, die nach Dixon auf einer Reizung der regionalen vasoconstrictorischen Ganglien beruhen soll. Hierfür spricht auch, daß die vom Nicotin ausgelöste

Blutdrucksteigerung durch Hexamethonium vollständig beseitigt wird, während äquivalente Nor-Adrenalindosen unbeeinflußt bleiben.

Um zwischen antiadrenergischer und anti-Nicotinwirkung zu differenzieren, haben wir die Abschwächung blutdruck-äquivalenter Nicotin- und Nor-Adrenalindosen durch i. v. Raubasininjektionen als Kritrium benutzt. Aus dem in Abb. 7 wiedergegebenen Versuchsbeispiel ist zu ersehen, daß nach 300 γ/kg Raubasin, einer Dosis, welche auch die Rückenmarksreflexe bereits herabsetzt, die vom Nicotin ausgelöste Blutdrucksteigerung stärker gehemmt wird als die vorher gleich hohe Wirkung des Nor-Adrenalins. Von insgesamt 9 Versuchen führten 6 zu den

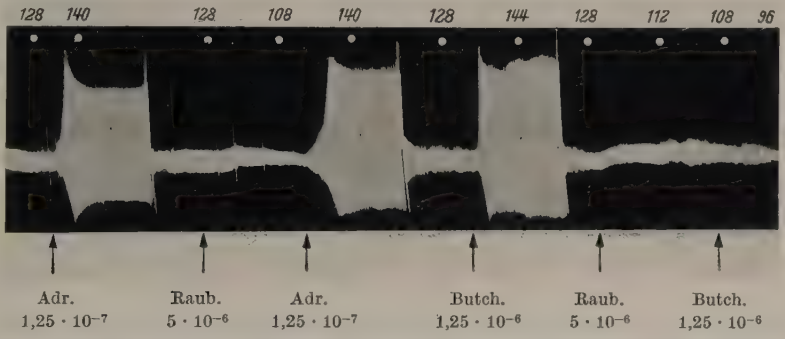


Abb. 8. *Hemmung der Butyrylcholinwirkung durch Raubasin am isolierten Meerschweinchenvorhof.* Tyrodebad 80 cm³, 38° C. Die Zahlen über der Kurve geben die Frequenz pro min an. Raubasin wurde 2 min vor Adrenalin oder Butyrylcholin in das Badgefäß gegeben. Die Dosierungsangaben bedeuten Endkonzentration. *Adr* Adrenalinhydrochlorid. *Butch* Butyrylcholinchlorid. Die Butyrylcholinwirkung wird durch Raubasin aufgehoben, die des Adrenalins bleibt unbeeinflußt

gleichen Ergebnissen, wobei die Reihenfolge der Nicotin- und Nor-Adrenalin-Injektionen variiert wurde. In 3 Versuchen ließ sich kein Unterschied zwischen Nicotin und Nor-Adrenalin nachweisen. Nach höheren Raubasindosen (1—2 mg/kg) war eine Differenzierung nicht mehr möglich.

Eine nicotinhemmende Wirkung des Raubasins ergab sich auch in Versuchen am *isolierten Meerschweinchenvorhof. Butyrylcholin*[1] hat an diesem Testobjekt eine positiv inotrope und chronotrope Wirkung, die nach Ergebnissen von Holtz u. Westermann auf seiner nicotinartigen Wirkungskomponente beruht. Läßt man Raubasin in geeigneter Konzentration auf den Vorhof einwirken, so bleibt die frequenz- und kontraktionssteigernde Wirkung des *Adrenalins* unbeeinflußt, während die Wirkung des Butyrylcholins völlig ausgelöscht wird (Abb. 8). Wie in den Versuchen von Holtz u. Westermann mit Ganglienblockern, so ist auch

[1] Für die Überlassung von Butyrylcholin danke ich Herrn Dr. Credner, Diwag A. G., Berlin-Waidmannslust.

unter Raubasin nach Ausschaltung der nicotinartigen Wirkungskomponente der Durchbruch einer schwachen muscarinartigen Butyrylcholinwirkung an der Frequenzverlangsamung erkennbar.

Bemerkungen zu den Versuchsergebnissen

Auf Grund der früher nachgewiesenen antiadrenergischen Wirksamkeit des Raubasins lag es nahe, die Hemmung an der adrenergischen Gefäßinnervation zunächst als alleinige Ursache der *Kreislaufwirkungen* anzusehen. Für die Annahme eines *peripheren* Angriffspunktes spräche auch der Nachweis der muskulär-gefäßdilatatorischen Komponente.

Aus dem Verhalten anderer Sympathicolytica geht hervor, daß deren Kreislaufwirkung nicht zwangsläufig und ausschließlich eine Folge der adrenergischen Hemmung zu sein braucht:

Yohimbin hat z. B. am Katzenblutdruck eine schwächere Adrenalin- und Nor-Adrenalin-hemmende Wirkung als Regitin, aber eine relativ stärkere depressorische Wirkung auf die Blutdruckhöhe. Die dihydrierten Mutterkornalkaloide steigern am Spinaltier den Blutdruck und führen nur bei intakter Verbindung zwischen Medulla und oberem Thorakalmark zu Blutdrucksenkungen (Konzett u. Rothlin), was auf eine Beteiligung medullärer Zentren hinweist.

Nach Untersuchungen von v. Euler u. Schmiterlöw ist die Ursache des Dämpfungseffektes von *Ergotamin* auf barorezeptive Kreislaufreaktionen in einem Angriff des Alkaloids an den vasomotorischen Zentren zu suchen.

Die neuen Beobachtungen über die Raubasinwirkung auf die Entlastungs- und Belastungsreaktion des Carotissinus sprechen dafür, daß neben der Gefäßperipherie auch zentrale Mechanismen des Kreislaufs von der Wirkung betroffen werden. Zu ähnlichen Schlüssen sind Schmitt u. Gonnard in Untersuchungen an adrenalektomierten Katzen gekommen, bei denen die nach Reizung des zentralen Ischiadicusstumpfes auftretende Blutdrucksteigerung durch Raubasin stärker als der Blutdruckanstieg nach peripherer Splanchnicusreizung gehemmt wurde. Die bevorzugte Unterdrückung der zentral-reflektorischen Blutdrucksteigerung dürfte als Zeichen einer Erregbarkeitsherabsetzung in den vasoconstrictorischen Zentren zu werten sein.

Wieweit die *nicotinolytische Wirkung* des Raubasins am intakten Tier eine Rolle spielt, läßt sich nicht entscheiden. Versuche an der prä- und postganglionär gereizten Nickhaut der Katze haben keinen Anhaltspunkt für eine ganglionärblockierende Wirkung des Raubasins erkennen lassen, was jedoch mit der nicotinhemmenden Wirkung insofern nicht im Widerspruch zu stehen braucht, als die chemisch erzeugte ganglionäre Erregung leichter zu unterdrücken ist als die Transmission der präganglionären elektrischen Reizung (Kewitz; Exley).

In gewisser Analogie zu der nicotinolytischen Wirkung steht der Einfluß des Raubasins auf die *Reflexerregbarkeit des Rückenmarks*. Die Herabsetzung der ganglionären Erregbarkeit ist offenbar nicht nur auf bestimmte vegetative Ganglienzellen beschränkt, sondern auch im

cerebrospinalen System vorhanden. Die reflexhemmenden Dosen liegen ebenfalls im Bereich der antiadrenergischen Wirksamkeit. Möglicherweise steht die besonders am wachen Hund zu beobachtende motorische Inaktivierung und Erschlaffung mit dieser Raubasinwirkung im Zusammenhang, ähnlich etwa wie beim Mephenesin oder Meprobamat (Funderburk u. Unna; Berger). Schmitt u. Gonnard konnten mit Raubasin die Enthirnungsstarre von Katzen aufheben.

Beim *Yohimbin* liegen die Verhältnisse infolge seiner Erregungswirkung auf höhere motorische Zentren anders als beim Raubasin. Denn trotz der reflexhemmenden Wirkung am Spinaltier führt es am intakten Tier zu motorischen Erregungszuständen, so daß die höher gelegene Stimulierung (bzw. Enthemmung) wirksamer sein muß als die an sich vorhandene Reflexdämpfung im Rückenmark. Die zentral erregende Wirkung des Yohimbins ist evtl. auch für den von Loewe beobachteten Unterschied zwischen Yohimbin und Raubasin in der ejakulatorischen Wirksamkeit verantwortlich: Während Yohimbin in Kombination mit dem Barbiturat *Pernocton* an der Maus zu Ejaculationen führt, fehlt dieser Effekt bei gleichen oder höheren Raubasindosen.

Wieweit die *antiemetische Wirkung* des Raubasins mit der Herabsetzung der Reflexerregbarkeit zusammenhängt, ist aus unseren Ergebnissen nicht zu ersehen. Es ist wenig wahrscheinlich, daß sie durch die Ausschaltung der sympathischen Innervation hervorgerufen wird, zumal Busse u. Lendle beim *Dibenamin* keine antiemetischen Eigenschaften nachweisen konnten.

Ebensowenig wäre die *krampfhemmende Wirkung* des Raubasins als Folge einer peripheren adrenergischen Blockade verständlich, es sei denn, sie hinge mit einer Durchblutungsförderung durch Gefäßerweiterung in bestimmten Gehirnabschnitten zusammen. Laurence u. Stacey haben an adrenalektomierten Ratten eine *Steigerung* der Nicotin- und Cardiazolkrämpfe durch Adrenalin und Nor-Adrenalin, eine *Hemmung* durch Dibenamin, SKF 688, Yohimbin und Ergotamin beschrieben und die Vasodilatation im Gehirn für den antikonvulsiven Effekt der Sympathicolytica verantwortlich gemacht.

Wie eigene Vergleichsuntersuchungen von Yohimbinisomeren und -derivaten ergeben haben, besteht zwischen der krampffördernden und krampfhemmenden Wirkung einerseits und der adrenergisch blockierenden Wirkung andererseits keine quantitative Parallelität. So ist das *Diacetylcorynanthin* als Sympathicolyticum mehrfach stärker, in seiner Krampfwirkung aber erheblich schwächer als Yohimbin (Kroneberg).

Infolge dieser verschiedenen sich überschneidenden Wirkungsqualitäten stößt der Versuch, das Raubasin einer bestimmten pharmakologischen Stoffgruppe zuzuordnen, auf Schwierigkeiten. Die Bezeichnung „*Sympathicolyticum*" würde jedenfalls eine Spezifität vortäuschen, die nur an isolierten Organen, nicht aber am intakten Tier vorhanden ist.

Summary

The pharmacological properties of the Rauwolfia-alkoloid *Raubasin* (Ajmalicin, δ-Yohimbin) has been investigated in various test-objects under different experimental conditions. Raubasin has *adrenergic*

blocking effects with high specifity on the rabbit's uterus and guinea-pig's seminal vesicle. It inhibits the inhibitory action of Adrenalin on the isolated intestine but does not antagonize the blood-sugar rise after Adrenalin. The antiadrenergic properties are also evident in the cat's bloodpressure, where the potency of Raubasin against Adrenalin is 3 times less than that of Yohimbin.

Experiments with the isolated rabbits ear led to the conclusion that the *vasodilatory action* of Raubasin is mainly caused by its adrenergic blocking properties, but a weak antagonism against $BaCl_2$- and Angiotonin-vasoconstriction exists too. This could be demonstrated also in bloodpressure experiments with cats.

In *circulation experiments* an increase of the peripheral bloodflow and the heart rate after Raubasin in anaesthetized and nonanaesthetized dogs could be demonstrated, but little decrease of bloodpressure. The peripheral resistance of the vessels decreases and the minute-volumen of the heart is increased.

The circulatory changes after Raubasin are not only due to its adrenergic-blocking actions but also to a central effect on the vasomotor centers. The muscular dilatory action on the bloodvessels may have some influence too. Raubasin has remarkable effects on different parts of the *central nervous system*: the convulsions after Yohimbin and the toxicity of Amphetamin are diminished and in decerebrated cats mono- and polysynaptic spinal reflexes are inhibited.

Vomiting due to Veratrin-, Strophanthin- and Apomorphin-application is reduced or abolished by Raubasin in dogs. Also *nicotinolytic properties* can be demonstrated on guinea-pig's intestine, on the bloodpressure of adrenalectomized and decerebrated cats and the isolated atrium of guinea-pig's heart.

According to the quantitative relations between sympathicolytic and some central actions, Raubasin is not a specific adrenergic blocking agent but has as well other properties not related to adrenergic blockade.

Fräulein Marianne Melzenbach und Herrn Albrecht Stein danke ich für ihre experimentelle Mitarbeit.

Literatur

Achelis, J. D., u. G. Kroneberg: Naturwissenschaften **40**, 625 (1953).
Berger, F. M.: J. Pharmacol. a. Exper. Ther. **112**, 413 (1954).
Bernsmeier, A., u. J. Becker: Dtsch. Arch. klin. Med. **200**, 464 (1953).
Bircher, R., u. A. Cerletti: Helvet. med. Acta **16**, Suppl. 22, 13 (1949).
Broom, A. W., and A. J. Clark: J. of Pharmacol. **22**, 59 (1923).
Busse, W., u. L. Lendle: Arch. exper. Path. u. Pharmakol. **218**, 159; 169 (1953).
Chen, G., and Ch. R. Ensor: J. Pharmacol. a. Exper. Ther. **98**, 245 (1950).
Chopra, R. N., J. C. Gupta and B. Mukherjee: Indian J. Med. Res. **21**, 261 (1933).
Chopra, R. N., and M. Chakravarti: Indian J. Med. Res. **29**, 763 (1941).
Dixon, W. E.: Heffter's Handbuch d. exper. Pharmakologie **2,2** S. 673.

v. Euler, U. S., u. C. G. Schmiterlöw: Acta physiol. scand. (Stockh.) **8**, 122 (1944).
Exley, K. A.: Brit. J. Pharmacol. **9**, 170 (1954).
Funderburk, W. H., and K. Unna: J. Pharmacol. a. Exper. Ther. **107**, 344 (1953).
Göing, H., u. H. D. Kempe: Arch. internat. Pharmacodynamie **107**, 255 (1956).
Haack, E., A. Popelak, H. Spingler u. F. Kaiser: Naturwissenschaften **41**, 479 (1954).
Heinemann, H.: Ber. **67**, 15 (1934).
Holtz, P., u. H. Westermann: Arch. exper. Path. u. Pharmakol. **225**, 421 (1955).
Kewitz, H.: Arch. exper. Path. u. Pharmakol. **222**, 323 (1954).
Klohs, M. W., M. D. Draper, F. Keller, W. Malsch and F. Petracek: J. Amer. Chem. Soc. **76**, 1332 (1954).
Koll, W.: Arch. exper. Path. u. Pharmakol. **184**, 365 (1937).
Konzett, H., and E. Rothlin: Brit. J. Pharmacol. **8**, 201 (1953).
Kroneberg, G.: Arch. exper. Path. u. Pharmakol. **222**, 215 (1954).
Kroneberg, G.: unveröffentl. Ergebnisse.
Kroneberg, G., u. J. D. Achelis: Arzneimittel-Forsch. **4**, 270 (1954).
Laurence, D. R., and R. S. Stacey: Brit. J. Pharmacol. **8**, 62 (1953).
Litchfield, J. T., and F. Wilcoxon: J. Pharmacol. a. Exper. Ther. **98**, 99 (1949).
Loewe, S.: Persönl. Mitteilung.
Neuss, N., H. E. Boaz and J. W. Forbes: J. Amer. Chem. Soc. **76**, 3234 (1954).
Popelak, A., H. Spingler u. F. Kaiser: Naturwissenschaften **40**, 625 (1953).
Rothlin, E.: C. r. Soc. Biol. (Paris) **119**, 1302 (1935).
Rothlin, E.: Helvet. physiol. Acta **2**, C48 (1944); Schweiz. med. Wschr. **1946**, 1254.
Schmitt, H., u. P. Gonnard: Thérapie (im Druck; persönl. Mitteilung).
Schoen, R.: Arch. exper. Path. u. Pharmakol. **113**, 257 (1926).
Siddiqui, S. and R. H. Siddiqui: J. Indian Chem. Soc. **8**, 667 (1931).
Taugner, R., u. W. Culp: Arch. exper. Path. u. Pharmakol. **220** 423 (1954).
Weisenborn, F. L., M. Moore u. P. A. Diassi: Chem. and Ind. **1954**, 375.
Wright, S., u. A. Schweitzer: J. of Physiol. **88**, 459 (1937).

Priv.-Doz. Dr. G. Kroneberg, Mannheim-Waldhof, Sandhoferstr. 116

Arch. exper. Path. u. Pharmakol., Bd. 233, S. 98—111 (1958)

Aus dem Pharmakologischen Institut der Universität Frankfurt a. M.
(Direktor: Prof. Dr. P. Holtz)

Antagonistische Wirkung von Morphin und Cholinesterase-Hemmern auf das Atemzentrum*

Von

W. Schaumann

Mit 6 Textabbildungen

(Eingegangen am 14. Oktober 1957)

Es ist verschiedentlich versucht worden, die analgetische Wirkung des Morphins und verwandter Stoffe über einen „cholinergen Mechanismus" zu deuten. Diese Hypothese beruht auf folgenden Befunden: 1. Alle morphinähnlichen Analgetica hemmen mehr oder weniger stark die Cholinesterase (Bernheim u. Bernheim; Kuhn u. Surles; Slaughter, Parsons u. Munal; Adriani u. Rovenstine; Brindley; Eadie, Bernheim u. Fitzgerald; Greig u. Howell; Randall u. Lehmann; Knoll, Komlós u. Pórszász; Haas, Hohagen u. Kollmannsperger; Tonini; Young, Vander Ploeg, Featherstone u. Gross). 2. Die schmerzstillende Wirkung der Analgetica kann durch Cholinesterase-Hemmer verstärkt werden (Slaughter, Parsons u. Munal; Hand u. Audin; Flodmark u. Wramner; Christensen u. Gross; Frommel; Abaza et Grégoire; Oehlandt; Gordonoff u. Ehrlich). Nach diesen Untersuchungen würde das Wesen des „cholinergen Wirkungsmechanismus" der Analgetica in einer Hemmung der Cholinesterase zu erblicken sein.

Diese Konsequenz ist jedoch von den Befürwortern dieser Hypothese offenbar deshalb nicht ausgesprochen worden, weil die therapeutischen und toxischen Effekte der Analgetica grundverschieden sind von denen der Cholinesterase-Hemmer (ChEH). Dabei kann man die unterschiedlichen *peripheren* Wirkungen außer Betracht lassen, da sie für die Analgesie kaum von Bedeutung sein dürften. Es wird auch das *Zentralnervensystem* durch die Analgetica anders beeinflußt als durch die ChEH.

Die Verstärkung der Analgesie durch ChEH kann durch ganz verschiedene Mechanismen zustande kommen. Über den Wirkungsmechanismus der Analgetica sagt diese Potenzierung aber nur dann etwas aus, wenn

* Durchgeführt mit Unterstützung der Deutschen Forschungsgemeinschaft.

sie sich an den spezifischen Angriffspunkten der Analgetica im ZNS abspielt. Die Wechselwirkung zwischen Morphin und ChEH wurde daher an einem Testobjekt untersucht, das einen Vergleich der zentralnervösen Wirkungen der Substanzen an einem schärfer definierten Angriffspunkt erlaubt, als das bei der Prüfung der Analgesie der Fall ist.

Die Dämpfung des Atemzentrums durch die Analgetica ist bekannt und für ihre Wirkung spezifisch (O. Schaumann 1952; Haas, Hohagen u. Kollmannsperger). Auch die Wirkung der ChEH auf die Atmung ist vielfach untersucht worden (Douglas u. Matthews; DeCandole, Douglas, Lovatt Evans, Holmes, Spencer, Torrance u. Wilson; Erdmann, Kempe u. Lühning). Ihr Mechanismus ist komplexer Natur und setzt sich zusammen aus 1. einer Bronchokonstriktion, 2. einer Beeinflussung der neuromuskulären Übertragung und 3. einer direkten Wirkung auf das Atemzentrum.

Voraussetzung für die geplanten Versuche war daher eine Methode, die eine Differenzierung zwischen zentralen und peripheren Wirkungen der ChEH auf die Atmung erlaubt. Eine *Bronchokonstriktion* kann bei Beatmung mit konstantem Druck durch Messung des Atemvolumens (Konzett u. Rössler), bei Beatmung mit konstantem Volumen durch Messung des zur Dehnung der Lunge notwendigen Druckes registriert werden. In den vorliegenden Untersuchungen wurde letztere Methode gewählt, weil es darauf ankam, die Ventilation möglichst konstant zu halten. In Vorversuchen wurde sie mit der von Konzett u. Rössler verglichen. Sie erwies sich als hinreichend empfindlich, um eine Bronchokonstriktion zu erfassen.

Veränderungen der *neuromuskulären Übertragung* wurden an einem Phrenicus-Zwerchfellpräparat in situ beobachtet. Der periphere Stumpf des N. phrenicus einer Seite wurde elektrisch gereizt und die Kontraktionen der entsprechenden Zwerchfellhälfte registriert.

Die ebenfalls aufgezeichneten Bewegungen der anderen, innervierten Zwerchfellhälfte waren — bei Berücksichtigung von Veränderungen der neuromuskulären Übertragung — ein Maß für die Aktivität des *Atemzentrums*.

Methoden

Die Versuche wurden an Ratten, Mäusen und Meerschweinchen in Urethan-Narkose durchgeführt. Wenn nicht anders erwähnt, wurden beide Vagi durchschnitten.

Bei Ratten und Meerschweinchen wurde der *Blutdruck* in der Art. carotis über ein Membranmanometer gemessen. *Intravenöse* Injektionen erfolgten durch eine Kanüle in die Vena jugularis. Zur *intracisternalen* Injektion wurde die Membrana atlantooccipitalis freipräpariert und die Spitze einer dünnen Injektionsnadel in die Cisterna magna eingestochen. Die Kanüle war so weit mit einem Polyäthylenschlauch überzogen, daß nur 1,5 mm an der Spitze herausragten. Dadurch wurde verhindert, daß die Kanüle zu weit in die Cisterna vordrang und das Gehirn verletzte. Der

Schlauch wurde mit mehreren Fäden an Muskulatur und Fascien im Nacken befestigt. Sein toter Raum betrug weniger als 0,01 ml.

Zur Präparation des Zwerchfells wurde der Bauchraum entlang dem Rippenbogen breit eröffnet. Leber und Magen wurden nach unten gezogen und das Zwerchfell bei künstlicher Beatmung sagittal gespalten. Die Gefäßversorgung der linken Hälfte wurde dabei zum Teil durchtrennt. Injizierte Pharmaka erreichten trotzdem noch die neuromuskulären Endplatten, wie die prompte Hemmung beider Zwerchfellhälften durch Curare in Abb. 2 zeigt. Sicherheitshalber wurde die neuromuskuläre Übertragung stets an der rechten Zwerchfellhälfte mit intakter Blutversorgung geprüft. Der Phrenicus der rechten Seite wurde am Hals durchtrennt und der periphere Stumpf alle 1,2 sec mit einer Serie von 5—6 Kondensatorentladungen von supramaximaler Intensität bei einer Frequenz von 45/sec gereizt. In einigen Versuchen wurde eine größere Zahl von Impulsen in größeren Abständen appliziert; die Ergebnisse wurden dadurch nicht beeinflußt. Einzelimpulse führten zu keiner erfaßbaren Zuckung. Die Kontraktionen beider Zwerchfellhälften wurden isotonisch registriert. Die Belüftung war so eingestellt, daß annähernd normale Atembewegungen vorhanden waren.

In den Versuchen an Mäusen wurde das Zwerchfell bei intakter Innervation vorn von seinem Ansatz am Rippenbogen abgetrennt und seine Bewegungen aufgezeichnet. Die Tiere wurden mit einer kleinen Starling-Pumpe[1] beatmet. Injektionen erfolgten in die Schwanzvene.

Folgende Pharmaka wurden verwendet: Eserinsalicylat, Prostigminsulfat[2], Morphinhydrochlorid, Atropinsulfat, 2-(N-p-Tolyl-N-m-oxyphenyl-aminomethyl)-imidazolin (Regitin), L-Adrenalinbase und L-Noradrenalinbase.

Ergebnisse

Eine *Bronchokonstriktion* kann bei der Ratte weder durch Vagusreiz, noch durch intravenöse Injektion von Acetylcholin ausgelöst werden (Schaumann 1957b). Auch ChEH waren ohne Wirkung auf die bei dieser Tierart anscheinend schwach ausgebildete Bronchialmuskulatur, selbst wenn die Vagi nicht durchschnitten wurden. Für die geplante Untersuchung der zentralen Wirkung der ChEH war das günstig, da sich eine sekundäre Erregung des Atemzentrums infolge verminderter Belüftung der Lunge von vornherein ausschließen ließ.

Die *neuromuskuläre Übertragung* war bei der Ratte sehr empfindlich gegen ChEH. Sie wurde z. B. durch 0,1 mg Eserin stark gehemmt. Da es sich hierbei um eine Wedensky-Hemmung handelt, wäre bei Verwendung von Einzelreizen wohl kein Block aufgetreten. Impulsserien mit einer Frequenz von 45/sec kommen jedoch den physiologischen Verhältnissen sicher näher. — Die Abnahme der Kontraktionsstärke der innervierten Zwerchfellhälfte in Abb. 1 darf demnach nicht auf eine zentrale Atemhemmung zurückgeführt werden.

---

[1] Die Atempumpe für Kleintiere wurde vom Mechanikermeister des Institutes, Herrn K. Röhnert, entworfen und gebaut.

[2] Der Fa. Hoffmann-La Roche, Grenzach, danke ich für die Überlassung von Versuchsmengen des Präparates.

Eserin verminderte aber nicht nur die Stärke der Atembewegungen, sondern auch ihre Frequenz, im Versuch der Abb. 1 von 33/min auf 24/min. Diese Abnahme der Atemfrequenz kann nur durch eine Hemmung des *Atemzentrums* erklärt werden. Der starke Anstieg des Blutdrucks

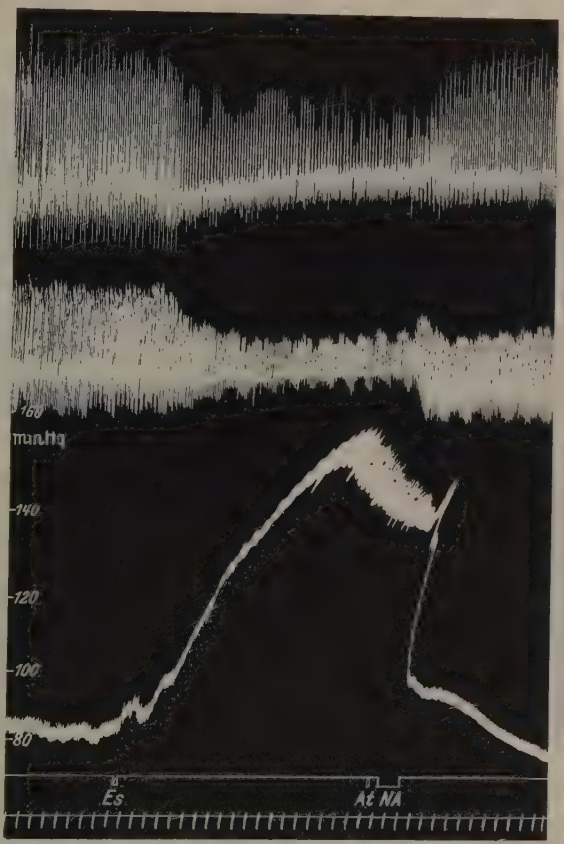


Abb. 1. *Zentrale und periphere Hemmung der Atmung durch Eserin intravenös.* — Ratte, 160 g, bivagotomiert. Von oben nach unten: innervierte Zwerchfellhälfte; über N. phrenicus gereizte Zwerchfellhälfte; Blutdruck; Signalschreiber; Zeitmarkierung alle 10 sec. — Bei *Es* 0,1 mg Eserin i.v., bei *At* 1 mg Atropin, bei *NA* 0,01 mg Noradrenalin

nach Eserin ist ebenfalls zentral ausgelöst (Dirnhuber u. Cullumbine; Varagić; Hornykiewicz u. Kobinger). Er trat in Evipan-Narkose nicht auf.

Atropin hob nicht nur die zentralen Wirkungen von Eserin auf, es verbesserte auch die durch Eserin gehemmte neuromuskuläre Übertragung (Abb. 1). Es ist dies ein Musterbeispiel für die curareartige Wirkung von Atropin (Bülbring). In diesem Versuch und in dem der Abb. 2 wurde Noradrenalin gegeben, um den starken Blutdruckabfall

nach Atropin abzufangen, der sonst leicht zu einem Kollaps führte. Noradrenalin allein brachte die Atmung nicht wieder in Gang.

Welche Bedeutung Veränderungen der neuromuskulären Übertragung durch Eserin und Prostigmin für ihre Wirkung auf die Atmung haben, geht besonders deutlich aus Abb. 2 hervor. In diesem Versuch wurde die Atmung zuerst durch Curare gelähmt. 0,05 mg Prostigmin, die ohne vorherige Gabe von Curare die neuromuskuläre Übertragung beträchtlich verminderten, durchbrachen den neuromuskulären Block und brachten damit die Atmung wieder in Gang. Eine zentrale Wirkung

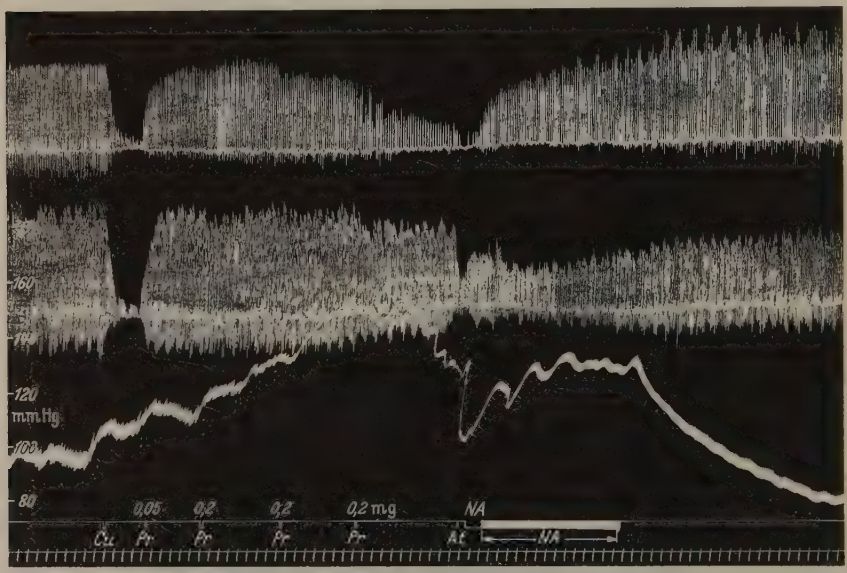


Abb. 2. *Periphere und zentrale Hemmung der Atmung durch Curare und Prostigmin intravenös.* — Ratte, 160 g, bivagotomiert. Versuchsanordnung wie in Abb. 1. Bei *Cu* 10 μg d-Tubocurarin, bei *Pr* die angegebenen Mengen Prostigmin i.v., bei *At* 0,5 mg Atropin, bei *NA* je 0,01 mg Noradrenalin schnell (Markierung) bzw. langsam (weißer Streifen) i.v.

war bei dieser Dosis von Prostigmin noch nicht zu beobachten. Nach Curare konnten bei der Ratte sehr hohe Dosen von Prostigmin gegeben werden, ohne die neuromuskuläre Übertragung wieder zu blockieren. Im Versuch der Abb. 2 waren die Kontraktionen der über den N. phrenicus gereizten Zwerchfellhälfte selbst nach insgesamt 0,65 mg Prostigmin — das sind 4 mg/kg! — nicht nennenswert abgeschwächt. Dagegen traten jetzt *zentrale* Wirkungen von Prostigmin hervor: Die starke Abschwächung der Kontraktionen der innervierten Zwerchfellhälfte kann kaum mehr durch Hemmung der neuromuskulären Übertragung erklärt werden, und die Abnahme der Atemfrequenz von 36/min auf 25/min entspricht ganz der zentralen Wirkung von Eserin in Abb. 1. Eine Injektion von Atropin lieferte die Bestätigung dafür, daß es sich hier

um eine zentrale Wirkung von Prostigmin handelte: Frequenz und Stärke der Atembewegungen wurden durch die zentrale Wirkung von Atropin normalisiert, obwohl es — entsprechend seiner curareartigen Wirkung — die durch Prostigmin verbesserte neuromuskuläre Übertragung hemmte.

Eine *zentrale* Atemlähmung konnte auch durch intracisternale Injektion von Eserin und Prostigmin erreicht werden. Bemerkenswert

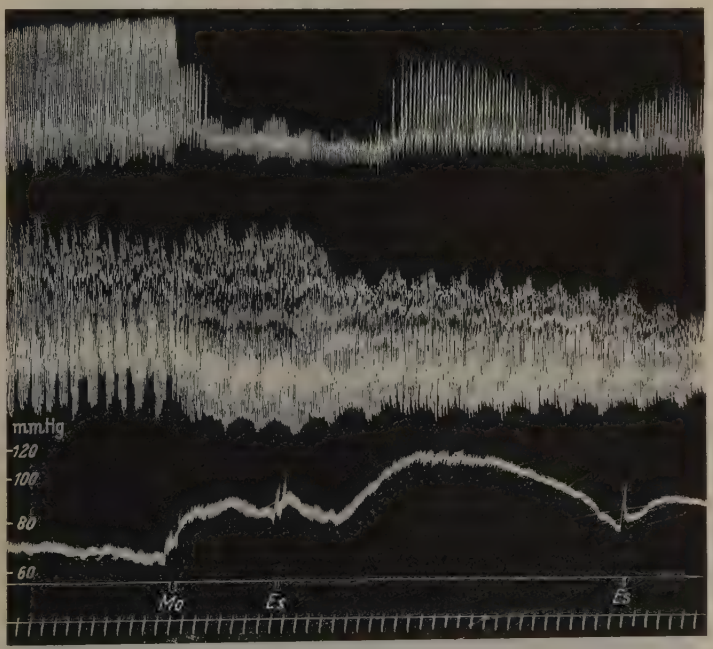


Abb. 3. *Eserin durchbricht die Lähmung des Atemzentrums durch Morphin.* Ratte, 290 g, bivagotomiert. Versuchsanordnung wie in Abb. 1. Bei *Mo* 5 mg Morphin, bei *Es* je 0,1 mg Eserin i.v.

waren die hohen Dosen von Prostigmin, die dabei gegeben werden mußten: 0,1 mg Prostigmin i.c. hatten etwa dieselbe Wirkung wie 0,05 mg Eserin i.c., obwohl dieses in der Peripherie und in vitro weit schwächer ist als Prostigmin (Koppanyi u. Karczmar).

Eine *zentrale* Wirkung ist auch der Blutdruckanstieg nach i. v. Injektion hoher Dosen (Abb. 2) und nach intracisternaler Gabe von Prostigmin (Hornykiewicz u. Kobinger und Abb. 5). Kleine intravenöse Dosen, die nicht nennenswert in das ZNS eindringen, senken bei der Ratte den Blutdruck oder lassen ihn unbeeinflußt (Hornykiewicz u. Kobinger; Medacović u. Varagić).

Die Atemlähmung nach *Morphin* ist rein zentral bedingt. In den Versuchen an Ratten wurden 25—30 mg/kg Morphin benötigt, um eine dann allerdings komplette Hemmung der Atmung herbeizuführen wie in Abb. 3. Die kleinen Bewegungen der innervierten Zwerchfellhälfte waren

durch die künstliche Beatmung verursacht. Der Blutdruck wurde durch Morphin etwas gesteigert, die neuromuskuläre Übertragung blieb unverändert. Im Versuch der Abb. 3 fielen lediglich die Schwankungen der Kontraktionshöhe weg, die durch Interferenz mit der spontanen Atmung bedingt waren.

Auch nach Gabe einer atemlähmenden Dosis Morphin hemmte Eserin die neuromuskuläre Übertragung und steigerte den Blutdruck

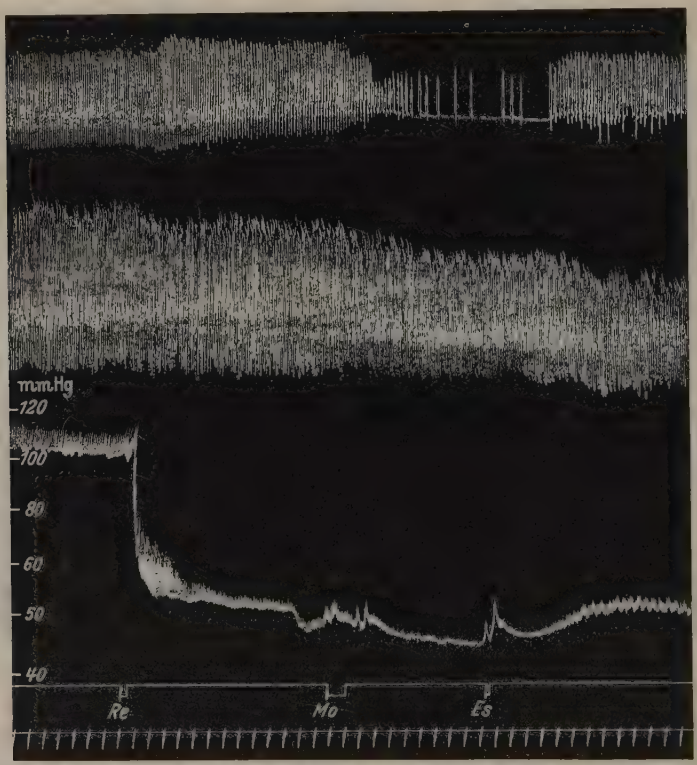


Abb. 4. *Regitin verhindert den Blutdruckanstieg nach Eserin, nicht aber die Anregung der Atmung.* Ratte, 190 g, bivagotomiert. Versuchsanordnung wie in Abb. 1. Bei *Re* 1 mg Regitin, bei *Mo* 5 mg Morphin, bei *Es* 0,1 mg Eserin i.v.

(Abb. 3). Während jedoch dieselbe Dosis Eserin in Abb. 1 die Atemfrequenz herabsetzte, das Atemzentrum also dämpfte, kam jetzt zugleich mit dem Anstieg des Blutdrucks die gelähmte Atmung wieder in Gang. *Eserin durchbricht die Lähmung des Atemzentrums durch Morphin.*

Das Ausmaß der Blutdrucksteigerung und der Anregung der Atmung gingen in den einzelnen Versuchen annähernd parallel. Im Versuch der Abb. 3 stieg der Blutdruck nur mäßig an (vgl. Abb. 1). Dementsprechend

war auch die Durchbrechung der Atemlähmung nicht so eindrucksvoll und von kürzerer Dauer als in anderen Versuchen. Eine zweite Injektion von Eserin hatte noch einmal denselben Effekt, wenn auch schwächer. Trotzdem ist die Anregung der durch Morphin gelähmten Atmung nicht

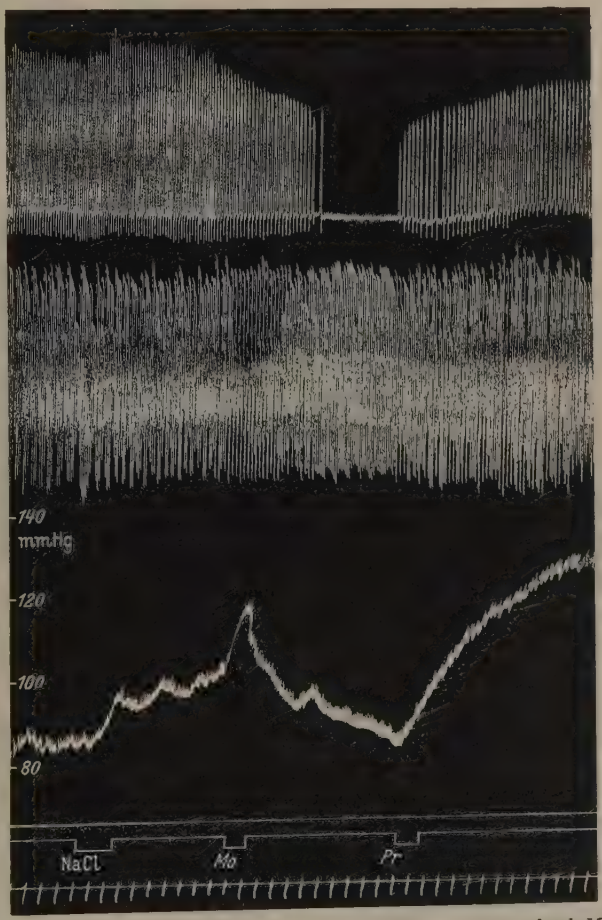


Abb. 5. *Prostigmin intracisternal durchbricht die Lähmung des Atemzentrums durch Morphin.* Ratte, 190 g, bivagotomiert. Versuchsanordnung wie in Abb. 1. Bei NaCl 0,1 ml physiol. NaCl-Lösung i.c., bei *Mo* 5 mg Morphin i.v., bei *Pr* 0,1 mg Prostigmin i.c.

von dem Blutdruckanstieg abhängig; beide sind vielmehr zwei voneinander unabhängige Symptome der zentralen Wirkung des Eserins. Das geht aus folgenden Versuchen hervor: Nach vorheriger Gabe von *Regitin* verursachte Eserin keinen Blutdruckanstieg mehr, brachte aber dennoch nach 25 mg/kg Morphin die Atmung wieder in Gang (Abb. 4), die in diesem Versuch auch nach längerer Zeit nicht mehr zum

Stillstand kam. Wurde der Anstieg des Blutdrucks durch einen Aderlaß aus der A. femoralis verhindert, so war die Erregung des Atemzentrums ebenfalls noch zu beobachten. Dagegen gelang es nicht, durch Injektion blutdrucksteigernder Dosen von *Adrenalin* oder *Noradrenalin* einen ähnlichen Effekt zu erzielen, obwohl der Blutdruckanstieg nach Eserin über eine Ausschüttung dieser Stoffe zustande kommt (Dirnhuber u. Cullumbine; Medacović u. Varagić).

Eine i.v. Injektion von *Prostigmin* konnte die Atemlähmung durch Morphin nicht durchbrechen, weil Prostigmin als quarternäre Stickstoffverbindung schlecht in das ZNS eindringt (Schweitzer, Stedman u.

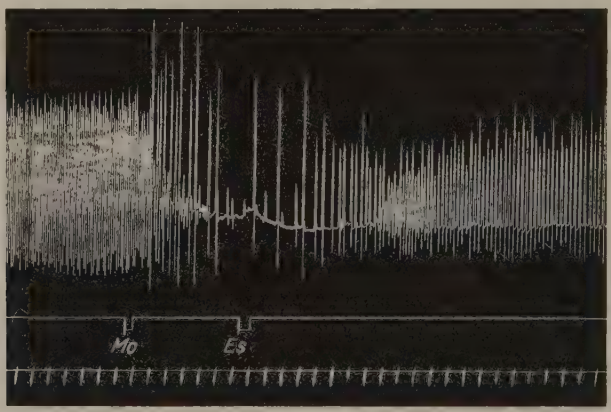


Abb. 6. *Eserin durchbricht die Lähmung des Atemzentrums durch Morphin.* Maus, 36 g, bivagotomiert, Kontraktionen des Zwerchfells. Bei *Mo* 2 mg Morphin, bei *Es* 0,04 mg Eserin i.v.

Wright; Koelle u. Steiner). Wurde Prostigmin jedoch unter Umgehung der Blut-Liquorschranke in die Cisterna magna injiziert, so wirkte es wie Eserin: Allein gegeben, verursachte es einen Blutdruckanstieg und eine zentrale Atemhemmung, nach Morphin dagegen stimulierte es das Atemzentrum. Das zeigt die Abb. 5. Wiederum wurde das Atemzentrum durch Morphin gelähmt. 0,1 mg Prostigmin, in die Cisterna magna injiziert, steigerte den Blutdruck und brachte die Atmung wieder in Gang. — Die neuromuskuläre Übertragung wurde bei intracisternaler Gabe von Prostigmin erst nach einiger Zeit geringgradig gehemmt, da das Prostigmin vermutlich langsam vom Liquor cerebrospinalis in die Peripherie gelangte.

Versuche an *Mäusen* führten zu ähnlichen Ergebnissen. 0,02—0,04 mg Eserin hatten auch hier eine lähmende Wirkung auf die Atmung. Morphin führte erst in einer Dosierung von 1—3 mg, das sind 25—75 mg/kg, zu einer Atemlähmung. Auch bei der Maus konnte die Atemlähmung durch Eserin durchbrochen werden (Abb. 6). Das zeigt, daß diese

Lähmung nicht durch eine allgemein toxische Wirkung des Morphins hervorgerufen wurde, weil eine solche durch Eserin schwerlich hätte behoben werden können.

Bei *Meerschweinchen* gelang es nicht regelmäßig, durch Morphin eine Atemlähmung hervorzurufen. Wenn jedoch nach 10 mg/kg Morphin eine Verminderung der Atemfrequenz auftrat, so konnte diese durch Eserin aufgehoben werden. Eserin allein beschleunigte die Atmung nicht und verursachte bei durchtrennten Vagi keine nennenswerte Bronchokonstriktion.

Besprechung der Ergebnisse

Es ist bekannt, daß ChEH mit einem tertiären Stickstoffatom wegen ihrer Lipoidlöslichkeit weit besser in das ZNS eindringen als solche mit einem quarternären (Schweitzer, Stedman u. Wright; Burgen u. Chipman; Koelle u. Steiner). Dadurch haben tertiäre Verbindungen vorwiegend zentrale, quarternäre vorwiegend periphere Wirkungen (Koelle u. Steiner; Kissel u. Domino). Umgeht man jedoch die Blut-Liquorschranke durch intrathecale Injektion, so haben tertiäre und quarternäre Verbindungen qualitativ dieselben zentralen Effekte (Calma u. Wright; Calma; Hornykiewicz u. Kobinger; Koelle u. Steiner). Die eigenen Befunde stimmen hiermit überein. Bei *intravenöser* Injektion hemmten 0,1 mg Eserin und 0,05 mg Prostigmin die neuromuskuläre Übertragung etwa gleich stark, doch zeigte nur Eserin zentrale Effekte. Bei *intracisternaler* Injektion dagegen wirkten *beide* Substanzen zentral; Eserin war jedoch wirksamer als Prostigmin, obwohl Prostigmin in der Peripherie und in vitro ein stärkerer ChEH ist als Eserin (Koppanyi u. Karczmar). Das spricht dafür, daß Eserin nicht nur besser durch die Blut-Liquor-Schranke, sondern auch besser durch die Zellmembranen des ZNS dringt als Prostigmin.

Die Lähmung des Atemzentrums durch Morphin konnte bei Ratten und Mäusen durch i.v. Gabe von Eserin und durch intracisternale Injektion von Eserin oder Prostigmin durchbrochen werden, nicht aber durch Prostigmin i.v. Die Aufhebung der Atemlähmung nach Morphin beruht daher mit Sicherheit auf einer *zentralen* Wirkung der ChEH, die um so eindrucksvoller war, als mit Eserin oder Prostigmin an sich eine Hemmung der Atmung gefunden wurde.

Erdmann Kempe, u. Lühning beobachteten an Hunden und Katzen eine Stimulierung der Atmung durch E 605. Wie aus den Abb. 1 u. 2 der zitierten Arbeit und aus einer persönlichen Mitteilung von Erdmann hervorgeht, war diese Anregung des Atemzentrums an Hunden in Morphin-Chloralose-Urethan-Narkose weit besser zu demonstrieren, als an Katzen, die kein Morphin erhalten hatten.

Andere Autoren haben bereits einen Antagonismus zwischen Morphin und Eserin beschrieben, ohne diesem Befund eine grundsätzliche Bedeutung zuzumessen.

So ist nach den Befunden von Wikler Eserin bei der Katze ohne Wirkung auf multisynaptische Reflexentladungen; es verstärkt sie aber, wenn sie vorher durch Morphin gehemmt werden. Diese Beobachtung entspricht der eigenen an der Atmung. — Am chronisch rückenmarkdurchtrennten Hund löst Eserin ähnliche Spontanbewegungen aus, wie sie bei Entziehung von Morphin am gewöhnten Tier auftreten. Sie werden, wie die Entziehungserscheinungen, durch Morphin verhindert (Wikler u. Frank). — Beim Hund kann man durch 10 mg/kg Morphin einen narkoseähnlichen Zustand erzeugen, aus dem er durch Eserin geweckt wird (Shaw u. Bentley). — Durch Druckerhöhung im Carotissinus ausgelöste Atemreflexe werden durch Morphin verstärkt, durch Eserin gehemmt (Marri et Hauss). — Beim Kaninchen wird die „arousal reaction" durch Morphin gehemmt (Silvestrini u. Longo), durch Eserin aber potenziert oder spontan ausgelöst (Longo; Lit. bei Bovet et Longo). Desgleichen hemmt Morphin den postrotatorischen Nystagmus, während Eserin ihn verstärkt (Longo u. Napolitano).

Der Antagonismus zwischen Morphin und den ChEH stellt eine Parallele dar zu den Ergebnissen am Meerschweinchendarm, wo die erregende Wirkung der ChEH durch Morphin unterdrückt werden kann (Schaumann 1958). Die Erklärung ist, daß Morphin am Darm die spontane Freisetzung von Acetylcholin herabsetzt und dadurch die Wirkung der ChEH aufhebt, die auf einer Anhäufung des freigesetzten Acetylcholins beruht (Paton; Schaumann 1956; 1957a).

Nach diesen Ergebnissen kann *die Lähmung des Atemzentrums durch Morphin am besten über eine Hemmung der Acetylcholin-Freisetzung an zentralen Synapsen* erklärt werden.

Die zentrale Atem*hemmung* durch Eserin und Prostigmin intracisternal ist wohl als eine Art zentraler Wedensky-Hemmung aufzufassen. Wenn man annimmt, daß bei der normalen Tätigkeit des Atemzentrums an den cholinergen Synapsen eine optimale Menge von Acetylcholin freigesetzt wird, dann kann eine Überschreitung dieses Optimums nur zu einer Funktionsstörung führen. Wird aber die Freisetzung von Acetylcholin durch Morphin vermindert und dadurch die Aktivität des Atemzentrums gehemmt, so wird eine Stabilisiernng der geringen noch abgegebenen Mengen von Acetylcholin durch ChEH dieser Hemmung entgegenwirken.

Der beschriebene Antagonismus des Morphins gegenüber der zentralen Wirkung der ChEH ist nicht mit dem des Atropins zu vergleichen. Morphin verhindert nicht die *Wirkung* von freigesetztem oder von außen zugeführtem Acetylcholin. Andererseits war Atropin allein ohne Wirkung auf das Atemzentrum, obwohl es dessen Beeinflussung durch ChEH aufhob. Die ChEH inaktivieren die Cholinesterase überall im Organismus, während die Wirkung der Analgetica auf ganz bestimmte Angriffspunkte beschränkt ist. Diesen Tatsachen muß bei ähnlichen Versuchen an anderen Testobjekten Rechnung getragen werden.

Der in den vorliegenden Befunden gezeigte *Antagonismus* zwischen Morphin und ChEH am Atemzentrum steht im Widerspruch zu

dem *Synergismus* dieser Substanzen im Bezug auf ihre analgetische Wirkung. Wie die Verstärkung der Analgesie durch ChEH zustande kommen könnte, soll in diesem Zusammenhang nicht diskutiert werden. Es sei nur darauf hingewiesen, daß eine *Erregung* von Zentren, welche die Schmerzempfindung hemmen, die Potenzierung durch die ChEH ebenso gut erklärt wie eine *Hemmung* der nociceptiven Bahnen, wie man sie für die Analgetica annehmen kann.

Fräulein Gisela Thielecke danke ich für ihre geschickte Mitarbeit.

Summary

In experiments on rats, mice, and guinea-pigs, the interactions were investigated between the effects of eserine, prostigmine (neostigmine), and morphine on the respiratory centre. Apart from the central effects of the cholinesterase inhibitors on respiration, their action on the neuromuscular junction was taken into account.

1. Intravenous injection of moderate doses of *eserine* reduced the frequency of respiration as well as neuromuscular transmission. *Prostigmine* affected neuromuscular transmission in smaller doses than eserine, whereas very large amounts were needed to produce a central effect on respiration. In the rat the cholinesterase inhibitors produced no bronchoconstriction.

2. On intracisternal injection, prostigmine caused a rise in blood pressure and an inhibition of the respiratory centre which closely resembled the effects of eserine given intravenously or into the cisterna magna.

3. *Atropin* showed a curare-like antagonism against the effects of the cholinesterase inhibitors on neuromuscular transmission and abolished their central effects.

4. *Morphine* produced a paralysis of the respiratory centre which was effectively antagonized by eserine intravenously and by eserine or prostigmine intracisternally. This antagonism is due to a central effect of the cholinesterase inhibitors.

5. It is suggested that morphine reduces the output of acetylcholine at central cholinergic synapses. The cholinesterase inhibitors stabilize the reduced amounts of acetylcholine liberated in spite of the presence of morphine and thereby antagonize the effects of this substance. Implications and limits of this hypothesis are discussed.

Literatur

Abaza, A., et M. Grégoire: Presse méd. **1952**, 331.
Adriani, J., and E. A. Rovenstine: Anesth. and Analg., N. Y. **20**, 109 (1941).
Bernheim, F., and M. L. C. Bernheim: J. Pharmacol. a. Exper. Ther. **57**, 427 (1936).

Bovet, D., et V. G. Longo: XX Int. Physiol. Congr., Brüssel, 1956, Abstr. of Rev. 306.
Brindley, C. A.: Federat. Proc. **3**, 5 (1944).
Bülbring, E.: Brit. J. Pharmacol. **1**, 38 (1946).
Burgen, A. S. V., and L. M. Chipman: Quart. J. Exper. Physiol. **37**, 61 (1952).
Calma, I.: J. of Physiol. **108**, 282 (1949).
Calma, I., and S. Wright: J. of Physiol. **106**, 80 (1947).
DeCandole, C. A., W. W. Douglas, C. Lovatt Evans, R. Holmes, K. E. V. Spencer, R. W. Torrance and K. M. Wilson: Brit. J. Pharmacol. **8**, 466 (1953).
Christensen, E. M., and E. G. Gross: J. Amer. Med. Assoc. **137**, 594 (1948).
Dirnhuber, P., and H. Cullumbine: Brit. J. Pharmacol. **10**, 12 (1955).
Douglas, W. W., and P. B. C. Matthews: J. of Physiol. **116**, 202 (1952).
Eadie, G. S., F. Bernheim and D. B. Fitzgerald: J. Pharmacol. a. Exper. Ther. **94**, 19 (1948).
Erdmann, W. D., H. D. Kempe u. W. Lühning: Arch. exper. Path. u. Pharmakol. **225**, 359 (1955).
Flodmark, S., and T. Wramner: Acta physiol. scand. (Stockh.) **9**, 88 (1945).
Frommel, E.: Actualités pharmacologiques, 3e série, Paris, Masson et Cie., 1951, 157.
Gordonoff, T., u. E. L. Ehrlich: Helvet. physiol. Acta **14**, C 22 (1956).
Greig, M. E., and R. S. Howell: Proc. Soc. Exper. Biol. a. Med. **68**, 352 (1948).
Haas, H., E. Hohagen u. G. Kollmannsperger: Arzneimittel-Forsch. **3**, 238 (1953).
Hand, L. V., and F. J. Audin: The Surgical Clinics of North America **24**, 718 (1944).
Hornykiewicz, O., u. W. Kobinger: Arch. exper. Path. u. Pharmakol. **228**, 493 (1956).
Kissel, J. W., and E. F. Domino: J. Pharmacol. a. Exper. Ther. **119**, 158 (1957).
Knoll, J., E. Komlós u. J. Pórszász: Acta physiol. (Budapest) **2**, 479 (1951).
Koelle, G. B., and E. C. Steiner: J. Pharmacol. a. Exper. Ther. **118**, 420 (1956).
Konzett, H., u. R. Rössler: Arch. exper. Path. u. Pharmakol. **195**, 71 (1940).
Koppanyi, T., and A. G. Karczmar: J. Pharmacol. a. Exper. Ther. **101**, 327 (1951).
Kuhn, H. H., and D. Surles: Arch. internat. Pharmacodynamie **58**, 88 (1938).
Longo, V. G.: Experientia (Basel) **11**, 76 (1955).
Longo, V. G., e L. Napolitano: Arch. internat. Pharmacodynamie **92**, 177 (1952); **99**, 215 (1954).
Marri, R., et W. Hauss: Arch. internat. Pharmacodyn. **63**, 449 (1939).
Medacović, M., and V. Varagić: Brit. J. Pharmacol. **12**, 24 (1957).
Oehlandt, G.: Med. Klin. **1955**, 2202.
Paton, W. D. M.: Brit. J. Pharmacol. **12**, 119 (1957).
Randall, L. O., and G. Lehmann: J. Pharmacol. a. Exper. Ther. **93**, 314 (1948).
Schandorf, J. A.: Praxis, Bern, **1951**, 257.
Schaumann, O.: Arch. exper. Path. u. Pharmakol. **216**, 48 (1952).
Schaumann, W.: Nature (Lond.) **178**, 1121 (1956).
Schaumann, W.: Brit. J. Pharmacol. **12**, 115 (1957a).
Schaumann, W.: Arch. exper. Path. u. Pharmakol. **231**, 378 (1957b).
Schaumann, W.: Arch. exper. Path. u. Pharmakol. **233**, 112 (1958).
Schweitzer, A., E. Stedman and S. Wright: J. of Physiol. **96**, 302 (1939).
Shaw, F. H., and G. A. Bentley: Austral. J. Exper. Biol. a. Med. Sci. **33**, 143 (1955).

Silvestrini, B., and V. G. Longo: Experientia (Basel) **12**, 436 (1956).
Slaughter, D., and R. W. Lackey: Proc. Soc. Exper. Biol. a. Med. **45**, 8 (1940).
Slaughter, D., J. C. Parsons and H. D. Munal: J. Amer. Med. Assoc. **115**, 2058 (1940).
Tonini, G.: Boll. Soc. ital. Biol. sper. **31**, 771 (1955).
Varagić, V.: Brit. J. Pharmacol. **10**, 349 (1955).
Wikler, A.: Proc. Soc. Exper. Biol. a. Med. **58**, 193 (1945).
Wikler, A., and K. Frank: J. Pharmacol. a. Exper. Ther. **94**, 382 (1948).
Young, D. C., R. A. Vander Ploeg, R. M. Featherstone and E. G. Gross: J. Pharmacol. a. Exper. Ther. **114**, 33 (1955).

Dr. W. Schaumann
Pharmakol. Inst. der Univ. Frankfurt/Main, Ludwig-Rehn-Str. 14

Arch. exper. Path. u. Pharmakol., Bd. 233, S. 112—124 (1958)

Aus dem Pharmakologischen Institut der Universität Frankfurt a. M.
(Direktor: Prof. Dr. P. Holtz)

Zusammenhänge zwischen der Wirkung der Analgetica und Sympathicomimetica auf den Meerschweinchen-Dünndarm *

Von

W. Schaumann

Mit 6 Textabbildungen

(Eingegangen am 14. Oktober 1957)

Morphin verursacht eine Freisetzung von Adrenalin und Noradrenalin in den Nebennieren (Bodo, Cotui u. Benaglia; Gross, Holland, Carter u. Christensen; Watts; Miller, George, Elliott, Sung u. Way) und im Gehirn (Vogt). Adrenalin und Noradrenalin wirken analgetisch (Weber; Gaisböck; Kiessig u. Orzechowski; Leimdorfer, Arana u. Hack; Leimdorfer u. Metzner; Leimdorfer). Daher fand die Hypothese von Ivy, Goetzl u. Burrill besondere Beachtung, wonach die schmerzstillende Wirkung der Analgetica über eine Freisetzung der Sympathicusstoffe zustande kommen soll.

Ein Vergleich der in der Literatur niedergelegten Befunde zeigt, daß auch am Meerschweinchen-Dünndarm Analgetica und Sympathicomimetica ähnliche Wirkungen haben: Methadon und Morphin hemmen Peristaltik und Nicotin-Kontraktionen bereits in sehr geringen Konzentrationen (O. Schaumann, Giovannini u. Jochum; W. Schaumann 1955; 1956a), während Acetylcholin-Kontraktionen erst durch sehr viel höhere Konzentrationen von Methadon unterdrückt werden, durch Morphin überhaupt nicht (Haas, Hohagen u. Kollmannsperger; Schaumann 1955). Auch Adrenalin und Noradrenalin hemmen Peristaltik und Nicotin-Kontraktionen in geringeren Konzentrationen als Acetylcholin-Kontraktionen (McDougal u. West). Die Wirkungsweise von Morphin auf den Meerschweinchendarm fand inzwischen ihre Erklärung in einer Hemmung der Abgabe von Acetylcholin (Ach) aus der Darmwand (Paton 1957; Schaumann 1957). Wie die folgenden Untersuchungen zeigen werden, reduzieren auch Adrenalin und Noradrenalin die Freisetzung von Ach.

* Durchgeführt mit Unterstützung der Deutschen Forschungsgemeinschaft.

In vergleichenden Versuchen mit Analgetica und Sympathicomimetica am Meerschweinchendarm wurde untersucht, ob die Wirkung der Analgetica durch eine intramurale Ausschüttung von Adrenalin oder Noradrenalin erklärt werden kann.

Methoden

Zur Bestimmung der *Freisetzung von Ach* aus der Darmwand wurden Darmstücke 1 Std lang in Tyrode unter Zusatz von Eserin 10^{-5} und Zufuhr von 95% O_2 + 5% CO_2 inkubiert. In den Versuchen der Tab. 1 wurde das Lumen mit Tyrode gefüllt, da nach den Ergebnissen von CHUJYO aus gedehnten Darmstücken mehr Ach abgegeben wird. Bei fortlaufender Bestimmung der Ach-Freisetzung wurden die Stücke nur an beiden Enden zugebunden, aber nicht gedehnt. Nach der Inkubation wurde die Badflüssigkeit mit dem halben Volumen N/100 HCl verdünnt und am Froschrectus ausgetestet. Durch die Verdünnung wird die Tyrode isotonisch mit Froschringer und so weit neutralisiert, daß eine Hydrolyse von Ach weitgehend vermieden wird.

Zur *fortlaufenden Bestimmung der Ach-Freisetzung* wurde etwa 1 g Darmgewebe in 6,5 ml Tyrode + Eserin inkubiert. Alle 7,5 min wurden 5 ml entnommen und mit N/100 HCl verdünnt. Je zwei Entnahmen wurden zu einer Probe zusammengegossen und am Froschrectus ausgetestet. Am Rectus lassen sich in Abständen von 10 min reproduzierbare Kontraktionen auslösen, so daß in einer halben Stunde jeweils zwei Proben und eine Standardlösung von Ach gegeben werden konnten. Da eine Probe aus 10 ml Eserin-Tyrode + 5 ml N/100 HCl bestand, wurde auch das Ach in 15 ml eines solchen Gemisches gelöst. Der Ach-Gehalt der Proben kann daher aus der Menge Ach abgelesen werden, die eine gleich starke Kontrollkontraktion auslöste (Abb. 1). Von den 6,5 ml Inkubationsflüssigkeit wurden bei jeder Entnahme 5 ml ausgewechselt, so daß nur ein geringer, leicht zu errechnender Unterschied besteht zwischen dem Gehalt der Proben und der in der entsprechenden Zeit in die Badflüssigkeit abgegebenen Menge von Ach.

Der *Gehalt des Gewebes an Ach* wurde nach der Methode von CHANG u. GADDUM bestimmt. Standardlösungen von Ach wurden unter Zusatz einer äquivalenten Menge von Extrakt hergestellt, dessen Ach-Gehalt durch Erhitzen mit NaOH zerstört wurde.

Die *coaxiale elektrische Reizung* des Darmes erfolgte nach der Methode von PATON (1955). Alle 10 sec wurde ein Einzelimpuls von 0,5 msec Dauer und maximaler Intensität gegeben. In diesen Versuchen wurde eine modifizierte Tyrode-Lösung verwandt: das $NaHCO_3$ wurde auf 0,2 g/l reduziert, 1 ml/l m/15 Phosphatpuffer p_H 7,0 zugesetzt und das Bad mit O_2 ohne Zusatz von CO_2 durchperlt. Dadurch wurde eine schnellere Rückkehr der Kontraktionen nach dem Auswaschen erreicht.

Das isolierte *Vagus-Magen-Präparat* wurde nach den Angaben von GREEFF u. HOLTZ hergestellt. Bei den Versuchen in situ wurde der Vagus am Hals gereizt und die Volumänderungen registriert.

Einzelheiten zu den Versuchen am Darm in der Anordnung von TRENDELENBURG sind bei SCHAUMANN (1955) angegeben.

Folgende Pharmaka wurden verwendet: Eserin, Prostigmin, 2-Benzyl-imidazolin (Priscol, Tolazoline)[1], 2-(N-p-Tolyl-N-m-oxyphenyl-aminomethyl)-imidazolin (Regitin, Phentolamine)[1], Acetoxy-thymoxy-äthyldimethylamin (Opilon), Diäthylaminomethylbenzodioxan (883 F)[1], L-Adrenalin, L-Noradrenalin, Atropin, Morphin,

[1] Für die Überlassung von Versuchsmengen bin ich Herrn Professor D. BOVET (883 F), Herrn Professor W. A. BAIN (TM 10) und der Ciba A. G. (Regitin, Priscol) sehr zu Dank verpflichtet.

Pethidin (Dolantin), L-Methadon (Polamidon), L-Levorphan (Dromoran), Levallorphan (L-N-allyl-norlevorphan, NAD), D,L-Isomethadon, L-Phenadoxon, Ketobemidon (Cliradon), Reserpin und Cholin-2,6-xylylätherbromid (TM 10)[1].

Ergebnisse

Hemmung der Acetylcholin-Freisetzung durch Adrenalin und Noradrenalin

Die Ergebnisse über den Einfluß von Adrenalin und Noradrenalin auf die Bildung und Freisetzung von Acetylcholin (Ach) in der Darmwand sind in Tab. 1 zusammengefaßt. Die Werte jeder waagerechten Reihe stammen aus einem Versuch am Darm eines Tieres. Jede Zahl ist der Mittelwert aus zwei Proben.

Tabelle 1. *Hemmung der Freisetzung von Acetylcholin aus der Darmwand durch Adrenalin und Noradrenalin*

	Acetylcholin-Gehalt im Gewebe			Acetylcholin-Freisetzung während Inkubation		
	nach Entnahme	nach 1 Std Inkubation				
		Kontrolle	(Nor)-Adren.	Kontrolle	(Nor)-Adren.	% Hemmung
Adrenalin	5,7	7,6	7,6	3,9	0,8	80
$5 \cdot 10^{-6}$	5,5	9,9	9,6	4,0	1,7	58
	7,7	11,3	10,7	4,1	1,5	63
Noradrenalin	8,7	18,0	19,0	4,3	1,9	56
$5 \cdot 10^{-6}$	9,3	12,6	11,7	4,7	1,9	60
	10,2	13,0	15,3	5,8	4,0	31

Der Ach-Gehalt des Gewebes nimmt bei Inkubation mit Eserin um $4{,}5 \pm 0{,}6$ μg/g und Std zu. Dieser Wert wurde aus 15 Doppelbestimmungen errechnet, die nur zum Teil in Tab. 1 angegeben sind. Adrenalin und Noradrenalin waren ohne Einfluß auf diese Zunahme. Daraus kann man schließen, daß die *Synthese* von Ach *nicht gehemmt* wird (Schaumann 1957).

Der Zusatz von 5 μg/ml L-Adrenalin oder L-Noradrenalin zur Badflüssigkeit verursachte eine starke *Abnahme der Ach-Freisetzung* aus der Darmwand. Ein quantitativer Vergleich der Wirkungsstärke von Adrenalin und Noradrenalin war nicht möglich, da die Ergebnisse von Versuch zu Versuch stark streuten.

Bei 37° C und einem p_H von 7,5 werden während 1 Std Inkubationsdauer beträchtliche Mengen von Adrenalin und Noradrenalin zerstört. Daher mußten in den Versuchen der Tab. 1 hohe Konzentrationen verwandt werden, um trotzdem während der ganzen Inkubationsdauer eine ausreichende Konzentration in der Badflüssigkeit zu haben. Bei fortlaufender Bestimmung der Ach-Freisetzung dagegen wurde der größte Teil der Inkubationsflüssigkeit alle 7,5 min erneuert. Das erlaubte, auch die Wirkung geringerer Konzentrationen zu

untersuchen. Abb. 1 zeigt die Auswertung eines solchen Versuches am Froschrectus. Während in der Kontrollperiode jede Probe etwa 0,8 μg Ach enthielt, wurden nach Zusatz von Adrenalin 10^{-8} nur noch 0,6 μg Probe gefunden. Eine Erhöhung der Konzentration von Adrenalin auf 10^{-7} reduzierte den Gehalt weiter auf etwa 0,23 μg Ach; durch eine weitere Erhöhung auf Adrenalin 10^{-6} wurde er nur mehr unbedeutend auf etwa 0,2 μg/Probe herabgesetzt. Dieser Versuch zeigt, daß Adrenalin die Ach-Freisetzung in denselben Konzentrationen herabsetzt, die zur Hemmung von Peristaltik, Nicotin-Kontraktionen (McDougal u. West) und elektrisch ausgelösten Kontraktionen notwendig sind. Diese

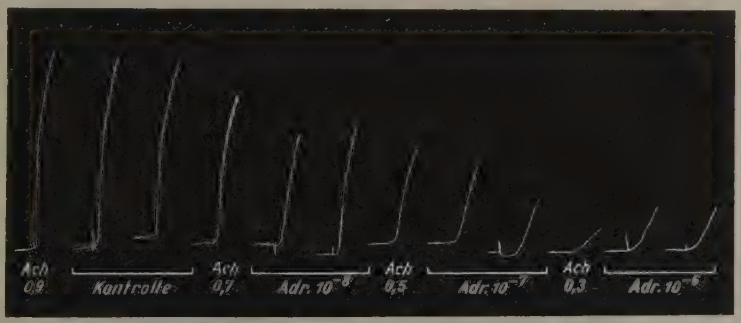


Abb. 1. Froschrectus, *Bestimmung der hemmenden Wirkung von Adrenalin auf die Freisetzung von Acetylcholin aus der Darmwand. Ach* Acetylcholin in μg/15 ml Standardlösung; *Adr* Adrenalingehalt der Inkubationsflüssigkeit für den Darm

Wirkungen von Adrenalin und Noradrenalin können somit ebenso wie die von Morphin auf eine Hemmung der Ach-Freisetzung aus postganglionären Nervenfasern (Schaumann 1956b; 1956c) zurückgeführt werden.

Wirken die Analgetica über eine Freisetzung von Adrenalin oder Noradrenalin?

Die Ergebnisse des vorigen Abschnittes zeigten, daß Adrenalin und Noradrenalin die Freisetzung von Ach aus der Darmwand hemmen. Damit ist die Möglichkeit gegeben, daß die Hemmwirkung der Analgetica am Meerschweinchendarm über eine Erregung sympathischer nervöser Elemente in der Darmwand zustande kommt. Nach den Ergebnissen von McDougal u. West heben Sympathicolytica (SL) die Hemmung von Peristaltik und Nicotin-Kontraktionen durch Adrenalin und Noradrenalin auf. Wenn Morphin den Darm durch Freisetzung der Sympathicusstoffe hemmt, dann sollte sich auch seine Wirkung durch SL aufheben lassen.

Die Methode von Paton (1955) war für diese Versuche besonders geeignet, da sich eine Reduktion elektrisch ausgelöster Kontraktionen

quantitativ besser abstufen läßt als eine Hemmung der Peristaltik. In den Versuchen der Abb. 2 wurden zunächst äquivalente Dosen von Adrenalin, Noradrenalin und Morphin ermittelt. Sie lagen für alle drei Pharmaka stets in der gleichen Größenordnung. Im Durchschnitt war Adrenalin etwa doppelt so wirksam wie Noradrenalin und Morphin. — Als SL wurden Priscol, Opilon, Regitin und 883 F verwendet. Regitin

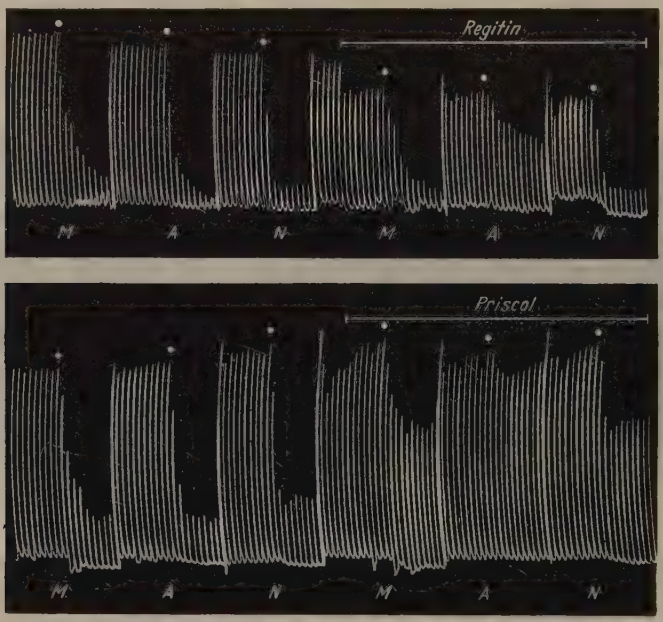


Abb. 2. *Beeinflussung der Wirkung von Morphin, Adrenalin und Noradrenalin durch Sympathicolytica.* Meerschweinchen-Ileum, elektrische Reizung, Badvolumen 5 ml. *M* Morphin, *A* Adrenalin, *N* Noradrenalin. Oben: *M* 0,3 μg, *A* 0,15 μg, *N* 0,3 μg; der weiße Strich: 20 μg Regitin. Unten: *M* 0,05 μg, *A* 0,05 μg, *N* 0,1 μg; der weiße Strich: 3 μg Priscol

hemmte in geringem Maße die elektrisch ausgelösten Kontraktionen. Es schwächte die Wirkung von Adrenalin prozentual stark ab, während die von Noradrenalin und Morphin nur wenig beeinflußt wurde (Abb. 2 oben). 883 F wirkte bei etwa 4mal geringerer Dosierung in gleicher Weise. Priscol und Opilon (Greeff u. Schümann) dagegen *verstärkten* die Kontraktionen. Auch diese SL waren gegen Adrenalin am wirksamsten, verminderten aber auch die Hemmwirkung von Noradrenalin und Morphin ganz beträchtlich (Abb. 2 unten). Opilon war etwa 3mal wirksamer als Priscol.

Verstärkung oder Abschwächung der Kontraktionen durch die SL selbst hat nichts mit ihrer sympathicolytischen Aktivität zu tun. Priscol und Regitin sind beide Imidazolin-Derivate, ihr Antagonismus gegen Sympathicomimetica beruht daher sicher auf denselben biochemischen

Vorgängen. Trotzdem wirkt Priscol erregend, Regitin aber hemmend auf den Darm. Zwischen dem erregenden Opilon und dem hemmenden 883 F besteht chemisch insofern eine Verwandtschaft, als in beiden Substanzen eine Benzolring über eine O_2-Brücke mit einem substituierten Äthylamin verbunden ist. Bei der Verstärkung bzw. Hemmung der Kontraktionen handelt es sich demnach um unspezifische Nebenwirkungen der SL. Dagegen ist der Antagonismus von Priscol und Opilon gegen Noradrenalin und Morphin auf ihre spezifische sympathicolytische Aktivität

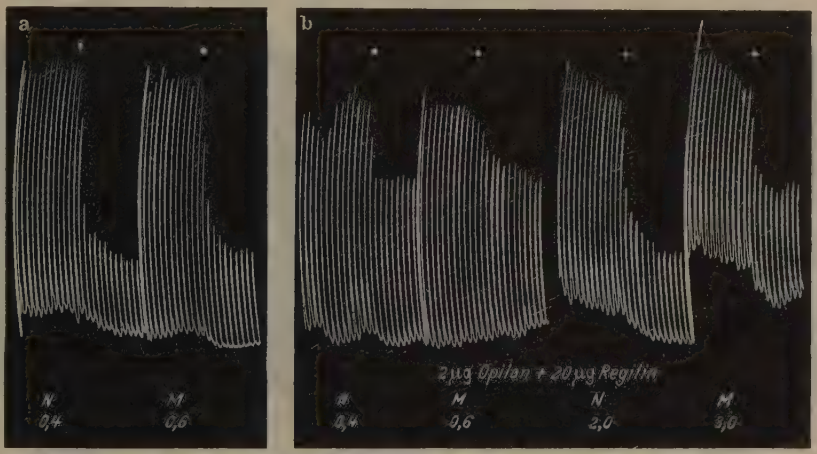


Abb. 3. *Hemmung der Wirkung von Noradrenalin und Morphin durch Sympathicolytica.* Meerschweinchen-Ileum, elektrische Reizung, Badvolumen 5 ml. *N* Noradrenalin, *M* Morphin, beides in µg. In b sind 2 µg Opilon + 20 µg Regitin im Bad

zurückzuführen und nicht auf ihre erregende (Neben-)-Wirkung, denn die Wirkung anderer hemmender Pharmaka wie z. B. Atropin wurde nicht abgeschwächt (Abb. 4).

Die erregende Wirkung von Opilon ließ sich zum Teil durch Zugabe von Regitin kompensieren. Im Versuch der Abb. 3 wurde ein Gemisch aus 1 Teil Opilon + 10 Teilen Regitin verwendet. Zu Beginn wurden 0,4 µg Noradrenalin und 0,6 µg Morphin als annähernd äquivalente Dosen ermittelt, die eine Abnahme der Kontraktionshöhe um 60—70% verursachten. 2 µg Opilon + 20 µg Regitin schwächten die Hemmwirkung beider Substanzen in gleichem Maße bis auf einen geringen Rest ab. Eine 5fache Erhöhung der Dosis von Noradrenalin und Morphin brachte ihre Wirkung in demselben Ausmaß wieder zum Vorschein. Der Effekt von Morphin wird durch SL demnach in gleicher Weise beeinflußt wie der von Noradrenalin. Dagegen scheidet Adrenalin als Überträgersubstanz für die Wirkung von Morphin aus. Seine Hemmbarkeit durch SL ging nicht mit der von Morphin parallel (Abb. 2), während Noradrenalin sich qualitativ wie auch quantitativ genauso verhielt wie Morphin.

Die Hemmung des Meerschweinchen-Dünndarms durch morphinähnliche Analgetica geht ihrer analgetischen Wirksamkeit parallel (O. Schaumann, Giovannini u. Jochum; Schaumann 1954; Paton 1957) Wie Abb. 4 zeigt, wird der Effekt äquivalenter Dosen aller Analgetica durch Opilon abgeschwächt, und zwar annähernd in demselben Maße. Die Analgetica senken zwar noch den durch Opilon erhöhten Tonus, schwächen aber die Stärke der Kontraktionen nicht mehr nennenswert ab. Dieser Antagonismus geht nicht auf die Erregung des Darmes durch Opilon zurück, denn Atropin hemmte nach Opilon noch genau so stark wie vorher.

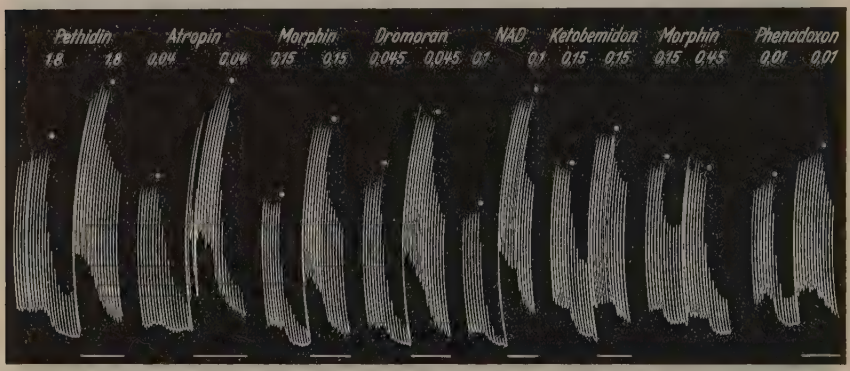


Abb. 4. *Aufhebung der Wirkung verschiedener Analgetica durch Opilon.* Meerschweinchen-Ileum, elektrische Reizung, Badvolumen 5 ml. Dosen der Analgetica und von Atropin in μg. Die weißen Striche: 2 μg Opilon im Bad

Paton (1957) beschrieb eine schnelle Abnahme der Empfindlichkeit des Darmes gegenüber Morphin. In Abb. 4 mußte gegen Ende des Versuches die 3fache Dosis von Morphin gegeben werden, um eine gleich starke Hemmung zu erzielen wie zu Beginn. Bei einem quantitativen Vergleich der geprüften Analgetica muß das berücksichtigt werden. Mit Methadon und Isomethadon wurde dasselbe Ergebnis erhalten wie mit den anderen Analgetica.

Fromherz u. Pellmont sowie Schaumann (1954) konnten die Wirkung von Dromoran und Morphin auf den Meerschweinchendarm *in situ* durch N-allyl-nor-Dromoran (NAD) bzw. N-allyl-normorphin (NAL) aufheben. Es war daher überraschend, daß in den in-vitro-Versuchen von Paton (1957) und in den eigenen Experimenten geringe Dosen von NAL bzw. NAD selbst die Kontraktionen abschwächten. Die Wirkung von NAD wurde wie die von Dromoran durch Opilon aufgehoben (Abb. 4). In diesem Zusammenhang sei darauf hingewiesen, daß NAL beim Menschen Analgesie hervorruft (Keats u. Telford).

Wie Abb. 4 zeigt, verhindert Opilon auch die Hemmung elektrisch ausgelöster Kontraktionen durch Pethidin. Dieses Ergebnis steht in

einem gewissen Gegensatz zu dem von McDougal u. West, wonach SL eine Hemmung der Peristaltik durch Pethidin nicht aufheben konnten. Die Diskrepanz dürfte auf methodische Unterschiede zurückzuführen sein: In eigenen Versuchen ließ sich die Lähmung der Peristaltik durch Adrenalin und Noradrenalin viel schlechter durch SL aufheben als die elektrisch ausgelöster Kontraktionen. Aus den Ergebnissen von McDougal u. West geht ferner nicht hervor, ob sie die Wirkung von Pethidin mit der von Adrenalin oder Noradrenalin verglichen und ausreichende Konzentrationen der SL verwendeten.

Reserpin setzt Adrenalin und Noradrenalin aus Hypothalamus (Holzbauer u. Vogt) und Nebennieren (Carlsson u. Hillarp; Holzbauer u. Vogt; Kroneberg u. Schümann; Holtz, Balzer u. Westermann) frei und vermindert ihren Gehalt an diesen Stoffen, wenn es etwa 4 Std vor der Entnahme der Organe injiziert wird. Kommt die Darmwirkung der Analgetica über eine Freisetzung von Noradrenalin aus der Darmwand zustande, so könnte sie vielleicht durch vorherige Gabe von Reserpin verhindert werden. Das war jedoch nicht der Fall. Weder eine Injektion von 5 mg/kg Reserpin 4 Std vor der Entnahme des Darmes, noch Zugabe von Reserpin $2 \cdot 10^{-5}$ zur Badflüssigkeit konnten die Hemmung elektrisch ausgelöster Kontraktionen durch Morphin aufheben.

TM 10 hemmt die Freisetzung von Noradrenalin aus sympathischen Nervenenden (Bain u. Fielden; Exley). Am Meerschweinchen-Ileum hat es eine Ach-artige Wirkung (Willey), gefolgt von einer Hemmung elektrisch ausgelöster Kontraktionen. Weder die Zugabe von TM 10 in die Badflüssigkeit, noch die intravenöse Injektion von 10 mg/kg 1 Std vor der Entnahme des Darmes schwächten die Wirkung von Morphin ab.

Die Hemmung von Peristaltik und Nicotin-Kontraktionen durch Adrenalin und Noradrenalin wurde von McDougal u. West auf eine Lähmung nervöser Strukturen zurückgeführt. Die Sympathicusstoffe greifen aber auch direkt an der glatten Muskulatur an. So hemmen sie z. B. Ach-Kontraktionen, gegen die Morphin unwirksam ist. Das zeigt, daß nur die Hemmung *nervöser* Strukturen durch Noradrenalin mit der Wirkung von Morphin verglichen werden kann.

Adrenalin und Noradrenalin erregen das terminale Ileum (Munro), hemmen aber die mittleren Abschnitte des Dünndarms. Morphin dagegen verursacht erst in der extrem hohen Konzentration von 10^{-4} gelegentlich eine geringfügige Kontraktion des terminalen Ileums, die jedoch auch an anderen Teilen des Dünndarms beobachtet werden kann. Dieser Befund spricht nicht gegen eine Freisetzung von Noradrenalin durch Morphin. Am terminalen Ileum werden Nicotin-Kontraktionen durch Noradrenalin 10^{-7} gehemmt, während 10mal höhere Konzentrationen

für eine Erregung erforderlich sind. Es ist nicht anzunehmen, daß so große Mengen von Noradrenalin durch Morphin überhaupt in kurzer Zeit freigesetzt werden können.

Ergänzende Untersuchungen zum Wirkungsmechanismus des Morphins

In früheren Versuchen wurde beobachtet, daß der Tonus des Meerschweinchendünndarms bei Zugabe von Morphin zur Badflüssigkeit absinkt, nach dem Auswaschen aber über das Ausgangsniveau hinaus ansteigt (Schaumann 1955). Die primäre Abnahme des Tonus ist wohl ebenso wie die anderen Wirkungen von Morphin am Darm durch Hemmung der Ach-Freisetzung zu erklären. Umgekehrt könnte die Erhöhung des Tonus nach dem Auswaschen von Morphin durch eine vermehrte Freisetzung von Ach zustande kommen. Dafür spricht, daß sie durch Eserin verstärkt wird. Das zeigt der Versuch der Abb. 5, der zugleich mit früher veröffentlichten (Schaumann 1955) durchgeführt wurde. Morphin unterdrückte nicht nur die Kontraktion der Längsmuskulatur bei Erhöhung des Innendruckes, sondern auch die erregende Wirkung des Eserins. Dieser Antagonismus zwischen Morphin und Eserin war der erste Hinweis dafür, daß Morphin die Freisetzung von Ach unterdrückt. Nach dem Auswaschen von Morphin und Eserin trat eine Kontraktion auf, wie sie ohne Eserin in ähnlicher Stärke nie beobachtet wurde (vgl. Schaumann 1955, Abb. 4). Auch Eserin allein verursachte keine so starke und vor allem keine so schnell ansteigende Kontraktion, schon gar nicht bei einem Darmstück, das wie im vorliegenden Versuch zur Ausschaltung der Peristaltik 24 Std bei 6° C aufbewahrt worden war. Die Erregung nach dem Auswaschen von Morphin ist deshalb von Interesse, weil sie an die zentrale Erregung erinnert, die bei Katzen einige Zeit nach Gabe hoher Dosen Morphin (Wikler) oder bei gewöhnten Hunden nach Entziehung von Morphin auftritt (Wikler u. Frank). Es wäre interessant zu untersuchen,

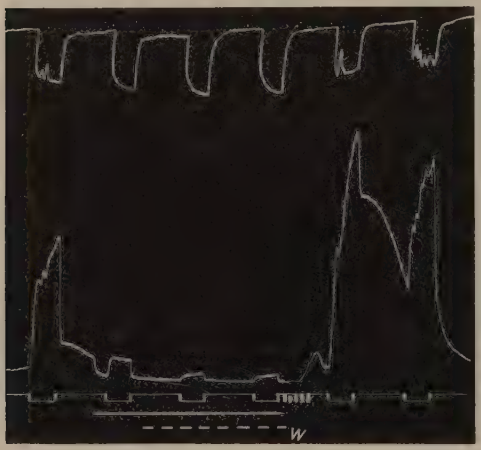


Abb. 5. *Antagonismus zwischen Eserin und Morphin*; *Erregung nach dem Auswaschen von Morphin.* Meerschweinchen-Ileum, 24 Std bei 6° C aufbewahrt. Anordnung nach Trendelenburg, oben Volumen, unten Längsmuskulatur. Badvolumen 45 ml. Während des Signals Erhöhung des Innendrucks auf 3 cm Wasser. Weiße Linie: 3 μg Morphin, weiße Striche: 2 μg Eserin zusätzlich im Bad. Anschließend wiederholtes Auswaschen durch Überlauf bei (*w*)

ob Entziehungserscheinungen beim Ganztier durch Eserin verstärkt werden.

Am isolierten Vagus-Magenpräparat (Greeff u. Holtz) ist Morphin unwirksam (Schaumann 1956b). Auch in vivo wurden die Magenkontraktionen nach Vagusreiz durch Morphin nur wenig reduziert. Unter den folgenden, in Abb. 6 demonstrierten Versuchsbedingungen kann man aber doch eine Wirkung von Morphin auf den Vagusreiz zeigen: Gibt man einem Meerschweinchen geringe Mengen eines Ganglienblockers i.v., so sind die Magenkontraktionen nach Vagusreiz verschwunden (Abb. 6b). Sie kommen aber wieder nach i.v. Injektion von

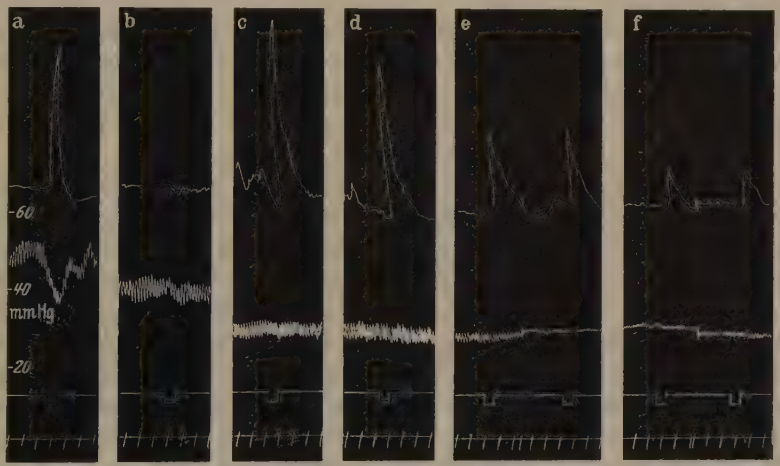


Abb. 6. *Hemmung der Acetylcholin-Freisetzung aus präganglionären Nervenfasern durch Morphin.* Meerschweinchen, 500 g, Urethan-Narkose, bivagotomiert. Von oben nach unten: Magenvolumen, Blutdruck, Signal, Zeit in 15 sec. Beim Signal Reizung des peripheren Stumpfes des rechten Vagus mit maximaler Intensität und 20 Imp/sec. a Kontrolle, b nach 3 mg/kg Pendiomid, c nach 0,05 mg/kg Prostigmin, d nach weiteren 3 mg/kg Pendiomid, e und f nach je 0,5 mg/kg Morphin

Eserin oder Prostigmin (Abb. 6c), wenn auch erst nach einer Latenzzeit und in der Regel nicht so stark wie in Abb. 6. Diese Kontraktionen können durch Ganglienblocker nicht mehr unterdrückt werden (Abb. 6d). Es ist anzunehmen, daß sie durch präganglionär freigesetztes Ach ausgelöst werden, das nicht zerstört wird und die gegen Ach sensibilisierte Muskulatur zur Kontraktion bringt. Dieser erste Teil des Versuches ließ sich auch in vitro wiederholen, nicht aber das in Abb. 6e u. f gezeigte Phänomen: Die durch präganglionär freigesetztes Ach ausgelösten Kontraktionen wurden durch Morphin gehemmt. Da Morphin gegen einmal freigesetztes Ach unwirksam ist, kann es nur die Freisetzung von Ach aus den präganglionären Nervenfasern verhindert haben. Ob das durch direkte Wirkung auf die Nervenendigungen oder indirekt durch Erregung sympathischer Nerven geschieht, kann nicht entschieden

werden. Adrenalin hemmt die Ach-Freisetzung am Ganglion cervicale superius (Paton u. Thompson), Morphin nicht (Paton 1957). Dies sowie die Unwirksamkeit von Morphin in vitro sprechen eher für eine indirekte Wirkung von Morphin.

Diskussion

Analgetica und Sympathicomimetica haben am Meerschweinchen-Dünndarm folgende gemeinsame Wirkungen: Sie hemmen die Peristaltik sowie elektrisch und durch Nicotin ausgelöste Kontraktionen, indem sie die Freisetzung von Ach aus postganglionären *nervösen Strukturen* vermindern oder aufheben (McDougal u. West; Schaumann 1955, 1956b, 1957; Paton 1957).

Die Sympathicomimetica haben darüber hinaus eine *spasmolytische* Wirkung (McDougal u. West), die man nur bei einem Teil der Analgetica beobachten kann, und dann nur in höheren Konzentrationen (Haas, Hohagen u. Kollmannsperger). Sie ist für ihre Wirkung nicht spezifisch (O. Schaumann, Giovannini u. Jochum).

Die gleichartige Wirkung von Analgetica und Sympathicomimetica auf *nervöse* Strukturen in der Darmwand läßt sich auf zwei Arten deuten: Entweder erregen die Analgetica sympathische Nerven in der Darmwand, oder sie greifen an denselben Receptoren an wie Noradrenalin, wirken also selbst wie Sympathicomimetica. Da eine Freisetzung von Noradrenalin aus dem Darm nicht direkt gemessen wurde, kann zwischen diesen beiden Möglichkeiten nicht entschieden werden. *Reserpin*, das den Adrenalin- und Noradrenalin-Gehalt von Gehirn (Holzbauer u. Vogt) und Nebennieren (Carlsson u. Hillarp; Holzbauer u. Vogt; Kroneberg u. Schümann; Holtz, Balzer u. Westermann) herabsetzt, und TM 10, das die Freisetzung von Noradrenalin aus postganglionären sympathischen Nervenfasern hemmt (Bain u. Fielden; Exley), verhindern die Wirkung von Morphin nicht. Ein positives Ergebnis wäre ein Beweis gewesen für eine Freisetzung von Noradrenalin aus der Darmwand durch Morphin; die geschilderten negativen Resultate schließen diese Möglichkeit nicht aus.

Die gleichartige Wirkung der Analgetica und Sympathicomimetica auf die Schmerzempfidung kann in gleicher Weise erklärt werden: Entweder greifen Analgetica und Sympathicomimetica an denselben Receptoren an, oder die Analgetica wirken über eine Freisetzung von Noradrenalin im ZNS.

Fräulein G. Thielecke danke ich vielmals für ihre Hilfe bei den Versuchen.

Summary

In experiments on the isolated intestine of the guinea-pig, the effects of morphine-like analgesics were compared with those of adrenaline and noradrenaline.

1. Adrenaline and noradrenaline reduce the output of acetylcholine from the intestinal wall as does morphine. The threshold concentration of adrenaline is about 10^{-8} w/v.

2. The inhibition by analgesics of contractions of the ileum on coaxial electrical stimulation is antagonized by sympatholytic drugs in the same way and to the same extent as that produced by noradrenaline.

3. These results may be explained in two ways: Either the analgesics act by liberating noradrenaline within the intestinal wall, or they occupy the same receptors as noradrenaline and act in the same way as this substance.

4. Washing out a paralysing dose of morphine leads to an excitation of the intestine which is potentiated by eserine. This excitation appears to be analogous to a symptom of withdrawal and is probably due to an increased output of acetylcholine.

Literatur

Bain, W. A., and R. Fiedlen: J. of Physiol. **133**, 70 P (1956).

Bodo, R. C., F. W. Cotui and A. E. Benaglia: J. Pharmacol. a. Exper. Ther. **61**, 48 (1937).

Carlsson, A., and N. A. Hillarp: Kgl. Fysiogr. Sällsk. Hdl. **26**, Nr. 8 (1956).

Chang, H. C., and J. H. Gaddum: J. of Physiol. **79**, 255 (1933).

Chujyo, N.: Amer. J. Physiol. **174**, 196 (1953).

Exley, K. A.: J. of Physiol. **133**, 70 P (1956).

Fromherz, K., u. B. Pellmont: Experientia (Basel) 8, 394 (1952).

Gaisböck, F.: Med. Klin. **1913**, 405.

Greeff, K., u. P. Holtz: Arch. exper. Path. u. Pharmakol. **227**, 427 (1956).

Greeff, K., u. H. J. Schümann: Arzneimittel-Forsch. **3**, 341 (1953).

Gross, E. G., H. Holland, H. R. Carter and E. M. Christensen: Anesthesiology **9**, 459 (1948).

Haas, H., E. Hohagen u. G. Kollmannsperger: Arzneimittel-Forsch. **3**, 238 (1953).

Holtz, P., H. Balzer u. E. Westermann: Arch. exper. Path. u. Pharmakol. **231**, 361 (1957).

Holzbauer, M., and M. Vogt: J. Neurochem. **1**, 8 (1956).

Ivy, A. C., F. R. Goetzl and D. Y. Burrill: War Medicine **6**, 67 (1944).

Keats, A. S., and J. Telford: J. Pharmacol. a. Exper. Ther. **117**, 190 (1956).

Kiessig, H. J., u. G. Orzechowski: Arch. exper. Path. u. Pharmakol. **197**, 391 (1941).

Kroneberg, G., u. H. J. Schümann: Arch. exper. Path. u. Pharmakol. **231**, 349 (1957).

Leimdorfer, A.: J. Pharmacol. a. Exper. Ther. **98**, 62 (1950).

Leimdorfer, A., R. Arana and M. H. Hack: Amer. J. Physiol **150**, 588 (1947).

Leimdorfer, A., and W. R. T. Metzner: Amer. J. Physiol. **157**, 116 (1949).

McDougal, M. D., and G. B. West: Brit. J. Pharmacol. **9**, 131 (1954).

Miller, J. W., R. George, H. W. Elliott, C. Y. Sung and E. L. Way: J. Pharmacol. a. Exper. Ther. **114**, 43 (1955).

Munro, A. F.: J. of Physiol. **118**, 171 (1952).

Paton, W. D. M.: J. of Physiol. **127**, 40 P (1955).

Paton, W. D. M.: Brit. J. Phyarmacol. **12**, 119 (1957).

Paton, W. D. M., and J. W. Thompson: XIX Int. Physiol. Congr. 1953, Montreal, S. 664.
Schaumann, O., M. Giovannini u. K. Jochum: Arch. exper. Path. u. Pharmakol. **215**, 460 (1952).
Schaumann, W.: Arch. exper. Path. u. Pharmakol. **223**, 348 (1954).
Schaumann, W.: Brit. J. Pharmacol. **10**, 456 (1955).
Schaumann, W.: Arch. exper. Path. u. Pharmakol. **229**, 41 (1956a).
Schaumann, W.: Arch. exper. Path. u. Pharmakol. **229**, 432 (1956b).
Schaumann, W.: Nature (Lond.) **178**, 1121 (1956c).
Schaumann, W.: Brit. J. Pharmacol. **12**, 115 (1957).
Trendelenburg, P.: Arch. exper. Path. u. Pharmakol. **81**, 55 (1917).
Vogt, M.: J. of Physiol. **123**, 451 (1954).
Watts, D. T.: J. Pharmacol. a. Exper. Ther. **102**, 269 (1951).
Weber, H.: Verh. dtsch. Ges. inn. Med. **21**, 616 (1904).
Wikler, A.: Proc. Soc. Exper. Biol. a. Med. **58**, 193 (1945).
Wikler, A., and K. Frank: J. Pharmacol. a. Exper. Ther. **94**, 382 (1948).
Willey, G. L.: Brit. J. Pharmacol. **12**, 128 (1957).

Dr. W. Schaumann
Pharmakolog. Inst. der. Univ., Frankfurt/Main, Ludwig-Rehn-Str. 14

Arch. exper. Path. u. Pharmakol., Bd. 233, S. 125—133 (1958)

Aus dem pharmakologischen Institut der Freien Universität Berlin

Zur antiphlogistischen Wirkung des Histaminliberators Compound 48/80, einiger Antihistaminica und einiger Antirheumatica

Von
MARTIN KRAMER

(Eingegangen am 25. Oktober 1957)

In vorangegangenen Arbeiten wurde die Pathogenese der Ovalbumin- und Dextranödeme der Ratte und ihre Reaktionen auf Pharmaka näher untersucht. Beide Ödemarten sind vollständig reversibel, für ihre Entstehung ist die durch beide Substanzen bewirkte Freisetzung von Histamin nicht von wesentlicher Bedeutung (KRAMER 1956). R. RÖSSLE, der histologische Präparate von Dextranödemen freundlicherweise beurteilte, deutete die Befunde als Grenzfall einer rein serösen Entzündung.

Die schnelle Reversibilität und die Verhinderung der Ödeme durch Eisenionen (KRAMER 1953) oder durch Propylenglykol (KITCHIN, SMITH, WALLACE, PERKINS u. MORRISON), sowie schließlich das Fehlen der von RÖSSLE auch für die seröse Entzündung geforderten Desmolyse und Histolyse lassen daran zweifeln, daß es sich hier um eine der rheumatischen serösen Entzündung beim Menschen vergleichbare Reaktion handelt. Damit ist ihr Wert als Test für antiphlogistische Wirkungen in Frage gestellt. HEUBNER hatte schon 1925 festgestellt, daß nur solche Substanzen echte Entzündungen hervorrufen, deren Wirkung mit einer Zellschädigung verbunden ist. Auch MENKIN sieht in einer Zellschädigung die Voraussetzung für das Entstehen jeder entzündlichen Reaktion, da nach seiner Hypothese die entzündungserregenden Stoffe erst aus der geschädigten Zelle freigesetzt werden.

Diese Argumente waren der Anlaß, nach einem anderen Modell einer experimentellen Entzündung zu suchen. Im Verlauf der Untersuchungen von SCHÖNE zur Isolierung des Ricins aus Ricinussamen im hiesigen pharmakologischen Institut wurden wir erneut auf die starken entzündungserregenden Eigenschaften dieser Substanz aufmerksam, die bereits EHRLICH beschrieben hatte. Es handelt sich beim Ricin um ein Protein mit dem Molekulargewicht 75000 (KABAT, HEIDELBERGER, BEEZER). Es ist außerordentlich toxisch. Am Kaninchen führen wenige Gamma/kg zum Tode (OSBORN, MENDEL, HARRIS). Der Vergiftungsmechanismus ist unbekannt.

Die Isolierung des benutzten Ricinpräparates erfolgte nach der Methode von Kabat, Heidelberger, Beezer. Das Molekulargewicht der erhaltenen kristallinen Substanz wurde von Herrn Dr. Kurth im Institut für Organische Chemie der Freien Universität (Direktor Prof. Dr. W. Lautsch) in der Ultrazentrifuge bestimmt. Es betrug 77000. Die Substanz ließ sich elektrophoretisch in 2 Fraktionen auftrennen. Die LD 50 betrug an Ratten bei intraperitonealer Injektion 19,0 γ/kg. Die Auswertung erfolgte nach Kärber.

Die außerordentlich kleinen Dosen von 0,25—0,5 γ Ricin subcutan oder i.m. injiziert, verursachten eine starke Entzündungsreaktion. Diese ist offenbar die Folge der primär zellschädigenden Wirkung des Ricins und geht in Abhängigkeit von der Dosis mit mehr oder weniger starken Nekrosen einher. Ihr Entstehungsmechanismus entspricht daher sehr gut den Forderungen Heubners und Menkins.

Bei allen Versuchen wurden Ratten an je einer Vorder- und einer Hinterpfote 0,5 γ Ricin subcutan injiziert, die in 0,02 ml aqua dest. gelöst waren. 24 Std nach der Injektion entwickelte sich ein entzündliches Ödem mit starker Hyperämie, welches nach 48 Std an Intensität noch weiter zunahm. Zu diesem Zeitpunkt waren bei verschiedenen Tieren bereits Nekrosen festzustellen. Die Nekrose war am 4. Tage bei allen Tieren voll ausgeprägt. Nach 10—15 Tagen begann die Eintrocknung und Verschorfung. Die Zeit bis zur völligen Abheilung betrug bei 47 Ratten im Mittel 28 Tage (siehe Tab. 1).

Besondere Aufmerksamkeit wurde der Frage gewidmet, welchen Anteil das Histamin an der Entstehung und dem Verlauf dieser Entzündungsform besitzt. Die Rolle des Histamins bei der Entzündung ist häufig untersucht worden. Haas (1941) hat besonders eingehend den Einfluß von Reizstoffen auf den Histamingehalt der Rattenhaut studiert. Mit seiner Methode erfaßte er auch das gebundene Histamin. Er fand nach 10 min langer Einwirkung von Senföl immer eine Zunahme von Histamin um etwa 50%, nach 20 min jedoch bereits wieder normalen Gehalt. Nach 1—2 Std bewirkten auch Cantharidin oder Crotonöl u. a. eine Zunahme des Histamingehaltes. Aus dieser Zunahme wird auf eine vermehrte Freisetzung von Histamin geschlossen. Aus den Untersuchungen von Feldberg u. Talesnik wissen wir heute, daß eine Freisetzung von Histamin mit einer entsprechenden Abnahme des gebundenen Histamins einhergeht, und daß die Resynthese von gebundenem Histamin außerordentlich langsam erfolgt. Danach scheint die von Haas gefundene erhebliche Zunahme der blutdrucksenkenden Wirkung von Hautextrakten 10 min nach Senfölapplikation nicht durch Histamin verursacht zu sein. Haas zeigte in späteren Untersuchungen (1942), daß sich dieser Effekt durch Paraldehyd oder Calcium verhindern ließ.

Früher hatten Gollwitzer-Meyer u. Bingel in Cantharidenblasen einen Stoff mit histaminähnlicher Wirkung gefunden. Ferner berichtete Hildebrandt über eine *Abnahme* des Hauthistamins 2—48 Std nach Senfölapplikation. Diese Untersuchungen waren unter anderem (weitere Literatur siehe Ehrich) der Grund, eine wesentliche Bedeutung des Histamins bei der entzündlichen Gewebsreaktion, zumindest im Beginn, anzunehmen.

Dies ist jedoch schon wegen der sehr kurz dauernden biologischen Wirkung des leicht diffusiblen Histamins, das durch die Amin- und Diaminoxydase rasch abgebaut wird, nicht sehr wahrscheinlich. Außerdem sind die Antihistaminica an vielen Entzündungsmodellen unwirksam oder unterscheiden sich in ihrer Wirksamkeit

erheblich (Rigdon, Last, Loew). In neuerer Zeit haben Stern u. Mitarb. das Problem untersucht, indem sie Ratten mit Compound 48/80 behandelten und dann nach der Granulombeutelmethode von Selye eine Crotonölentzündung setzten. Compound 48/80 setzt als sogenanntes Histaminliberator aus den Mastzellen (Riley) Histamin frei und ist imstande, das Gewebe fast vollständig an Histamin zu verarmen. Stern u. Mitarb. behandelten ihre Ratten am 1. Tage mit 150 γ/Tier und gaben jeden Tag 50 γ dazu bis zur Dosis von 350 γ pro Tier. Am 7. Tag applizierten sie Crotonöl, gaben den Histaminliberator jedoch weiter. Die Vorbehandlung in der angegebenen Weise ist nach Feldberg u. Talesnik sowie nach eigenen Untersuchungen völlig ausreichend, um die Haut auf das überhaupt erreichbare Maß von 3—10% an Histamin zu verarmen. Stern u. Mitarb. fanden, daß die Entzündungsreaktionen bei den behandelten Tieren wesentlich schwächer abgelaufen waren als bei den Kontrolltieren, und schlossen daraus, daß Histamin bei der Entzündung eine wichtige Rolle spielt.

Frühere Untersuchungen (Kramer 1956) hatten gezeigt, daß eine Vorbehandlung mit 11 mg/kg Compound 48/80 bereits genügt, um den Histamingehalt der Pfotenhaut bis auf etwa 5% zu reduzieren. Eine wesentlich stärkere Verarmung ist mit höheren Dosen auch nicht zu erreichen. Dennoch fiel damals auf, daß die mit kleineren Dosen vorbehandelten Tiere nach Dextraninjektion Ödeme an den Pfoten und Schnauzen bekamen, während die mit höheren Dosen behandelten Tiere gegen Dextran resistent waren. Ferner bekamen die allein mit Compound 48/80 behandelten Tiere starke Ödeme der Pfoten und Schnauzen erst zu einem Zeitpunkt, wenn sie an Histamin verarmt waren. Aus diesen Befunden ergibt sich, daß Histamin für die Genese der Ödeme nach Dextran oder Compound 48/80 keine wesentliche Bedeutung haben kann.

Die Untersuchungen von Stern u. Mitarb. haben das Interesse an diesem schon erledigt geglaubtem Problem neu belebt. Deswegen wurde untersucht, ob durch Vorbehandlung mit Compound 48/80[1] auch der Verlauf der Ricinentzündung zu beeinflussen ist und ob die Anwendung verschiedener Dosen des Histaminliberators, die zwar bezüglich der Histaminfreisetzung gleich wirksam sind, aber, ähnlich wie in den früheren Untersuchungen, auf entzündliche Vorgänge verschieden starke Effekte ausüben. In diesem Zusammenhang interessierte auch die Wirkung einiger Antihistaminica (Pyrilamin, Diphenhydramin und Promethazin) an diesem Modell. Falls Histamin ein wesentliches Glied im Entzündungsprozeß darstellt, sollte die Applikation derartiger Substanzen sich ähnlich auswirken wie die Vorbehandlung mit Coumpound 48/80. Ferner wurde auch Chlorpromazin geprüft, da es am Ovalbumin- und Dextranödem von allen Substanzen am wirksamsten war, obwohl seine Antihistaminwirkung geringer ist.

Darüber hinaus erschien es wissenswert, welchen Einfluß die gebräuchlichsten und altbekannten Antiphlogistica ausüben. Aminophenazon, Na-Salicylat und Phenylbutazon wurden zur Prüfung ausgewählt, weil ihre Wirkung auf das Eiklar- und Dextranödem aus eigenen Untersuchungen bekannt war und Vergleiche dadurch möglich wurden.

[1] Für die freundliche Überlassung von Compound 48/80 danke ich Herrn Dr. De Beer, The Welcome Research Laboratories, Tuckahoe 7 New York, USA.

Ergebnisse

a) Compound 48/80. 20 Ratten wurde in 8 Tagen mit insgesamt 26 mg/kg Compound 48/80 in steigender Dosierung vorbehandelt. Den 12 überlebenden Tieren wurde am 9. Tage 0,5 γ Ricin in je eine Vorder- und Hinterpfote subcutan injiziert. Das sich innerhalb von 48 Std entwickelnde entzündliche Ödem und die Nekrose waren von geringerem Ausmaß als bei den Kontrolltieren. Nach 16 Tagen war die Nekrose abgeheilt. Der Unterschied zur Heilungszeit bei den Kontrolltieren ist gut gesichert (Tab. 1). Eine weitere Gruppe von 9 Tieren wurde mit nur

Tabelle 1. *Beeinflussung der Heilungszeit der Recinnekrose an der Rattenpfote durch verschiedene Pharmaka*

Substanz	Tier-zahl	Dosis pro die i.p.	Zahl der Behand-lungstage	Zeit bis zur Heilung in Tagen	σ	ε	t	p
*vor*behandelt mit Compound 48/80	12	Gesamt 26 mg/kg	8	15,9	2,6	0,7	8,4	0,0002
vorbehandelt mit Compound 48/80	9	Gesamt 11 mg/kg	5	21,8	3,2	1,1	2,3	0,0008
Promethazin	10	30 mg/kg	2	16,2	1,7	0,6	8,6	0,0002
Pyrilamin	10	50 mg/kg	2	23,2	3,9	1,2	2,7	0,01
Pyrilamin	10	10 mg/kg	bis zur Abheilg.	21,3	4,5	1,4	3,5	0,001
Chlorpromazin	10	20 mg/kg	2	22,2	3,3	1,0	3,6	0,0008
Chlorpromazin	10	10 mg/kg	bis zur Abheilg.	26,6	10,5	3,3		
Aminophenazon	10	100 mg/kg	2	29,3				
Aminophenazon	31	100 mg/kg	bis zur Abheilg.	30,0	11,4	2,1		
Phenylbutazon	10	50 mg/kg	2	24,9	11,4	3,6	0,7	
Na-Salicylat	10	200 mg/kg	2	31,4				
Diphenhydramin	10	50 mg/kg	2	25,6	9,9	3,0	0,7	
Cortison lokal	27	400 γ pro Pfote	1	42,0	13,3	2,6	5,1	0,0002
Polyäthylenglykol 400 lokal	10	0,02 ml pro Pfote	1	25,4	7,0	2,2	1,7	
Kontrollen	47	—	—	27,7	8,0	1,2		

insgesamt 11 mg/kg Compound 48/80 in 5 Tagen vorbehandelt und anschließend die Ricininjektion in gleicher Weise vorgenommen. Die mittlere Heilungszeit betrug 22 Tage. Auch hier war sie gegenüber den Kontrollen signifikant verkürzt. Es fällt auf, daß diese Dosen bezüglich des histaminfreisetzenden Effektes gleich, bezüglich ihrer Schutzwirkung gegenüber Ricin aber deutlich verschieden wirksam sind. Hier kommt also erneut eine entzündungswidrige Wirkung von Compound 48/80

zum Ausdruck, die offensichtlich nichts mit der Histaminfreisetzung zu tun hat.

b) Antihistaminica und Antiphlogistica. In Tab. 1 sind ferner die Ergebnisse mit Promethazin, Pyrilamin, Chlorpromazin, Aminophenazon, Phenylbutazon, Na-Salicylat und Diphenhydramin verzeichnet. Bei der chronischen, täglichen Applikation der Substanzen — durchgeführt mit Pyrilamin, Chlorpromazin und Aminophenazon — ergab sich ein deutlicher Unterschied gegenüber den Kontrollen nur beim Pyrilamin. Durch die tägliche Behandlung mit 10 mg/kg verkürzte sich die Heilungszeit um 25%.

Die als Test benutzte Abheilungszeit wird einmal von der Intensität der nekrotisierenden Entzündung und zweitens durch die Geschwindigkeit der Reparationsvorgänge beeinflußt. Um eine Wirkung der geprüften Substanzen auf die Heilung auszuschließen, wurden in einer anderen Versuchsreihe die Substanzen nur zweimal gegeben, eine Dosis kurz vor der Ricininjektion und die zweite am darauffolgenden Tage. Da die Entwicklung der Ricinentzündung mehrere Tage dauert, werden bei den auf diese Weise erzielten therapeutischen Wirkungen Reparationsvorgänge am wenigsten beeinflußt. Am wirksamsten war die zweitägige Behandlung mit Promethazin, das in der Dosis von 30 mg/kg gegeben wurde und eine Verkürzung der Heilungszeit um 42% bewirkte. Die zweimalige Applikation von 20 mg/kg Chlorpromazin war deutlich weniger wirksam und reduzierte die Heilungsdauer nur um 20%. (Das Dosenverhältnis entspricht etwa dem Wirksamkeitsverhältnis am Dextranödem.) Der Befund, daß die chronische Applikation von Chlorpromazin keinen Effekt hatte, läßt den Schluß zu, daß es nicht nur die Entzündungsreaktion, sondern offenbar auch die Reparationsvorgänge hemmt. Pyrilamin dagegen war in beiden Versuchsreihen wirksam, so daß man hier eine Beeinflussung der Reparationsvorgänge ausschließen kann.

Die wirksamen Substanzen sind sämtlich Antihistaminica. Auch Chlorpromazin kann dazu gerechnet werden. Es ist nach eigenen Untersuchungen am Meerschweinchenasthma 10mal weniger wirksam als Chlortrimeton, nach Befunden von Kopera u. Armitage ist es am Meerschweinchenasthma 100mal und am -ileum 3mal weniger wirksam als Promethazin. Letzteres hat außer seiner Antihistamineigenschaft auch anticholinergische Wirkungen. Auffällig ist, daß ein weiteres geprüftes Antihistaminicum, Diphenhydramin, keinen Effekt hatte.

Die sogenannten Antiphlogistica hatten bei dieser bis zur Nekrose führenden Entzündungsform keine nennenswerte Wirkung.

c) Cortison[1]. An insgesamt 27 Ratten wurde in je eine Vorder- und Hinterpfote 0,5 γ Ricin und 400 γ Cortisonacetat (gelöst in 0,02 ml Polyäthylenglykol 400) injiziert. Das sich entwickelnde entzündliche Ödem

[1] Ich danke Herrn Prof. Dr. med. K. Junkmann, Schering-A.G., Berlin, für die freundliche Überlassung von Cortisonacetat.

hatte nach 24 und 48 Std eine deutlich stärkere Intensität als bei den Kontrollen. Die Heilungszeit war bei den einzelnen Tieren sehr verschieden und betrug im Mittel 42 Tage (siehe Tab. 1). Die Injektion der gleichen Menge Polyäthylenglykol 0,02 ml) rief keine Reaktion hervor. Die Applikation der gleichen Menge Polyäthylenglykol und 0,5 γ Ricin verursachte ein stärkeres entzündliches Ödem, hatte aber keinen Einfluß auf die Heilungszeit. Daraus geht hervor, daß die bei gleichzeitiger Gabe von Cortisonacetat gefundene erhebliche Verlängerung der Heilungszeit tatsächlich eine Cortisonwirkung ist. Dieser Effekt kann zwei Ursachen haben: 1. Durch die Hemmung der Gefäßreaktion ist die Exsudation von Flüssigkeit und Zellen stark vermindert und das Einströmen von Leukocyten und Makrophagen gehemmt; infolgedessen ist die Nekrose ausgeprägter als bei den unbehandelten Tieren, da das schädigende Agens länger einwirken kann. 2. Von vielen Autoren wurde eine Hemmung der Bildung von Granulationsgewebe und der Heilungsvorgänge durch Cortison beschrieben, so daß darin auch in diesen Versuchen eine Ursache der verzögerten Reparation zu sehen ist (Literatur in der Übersicht von Germuth).

Tabelle 2. *Histamingehalt der Pfotenhaut pro Tier, verschiedene Zeiten nach der Ricinapplikation*

	Zahl	Histamingehalt der Pfotenhaut pro Tier γ	σ	ε
Kontrollen	10	74,5	20,9	6,6
24 Std. nach Ricininjektion	10	68,2	10,7	3,4
48 Std nach Ricininjektion	10	86,7	14,0	4,4
4 Tage nach Ricininjektion	4	84,4	20,6	11,9

d) Histamingehalt der Haut während der Ricinentzündung. Um noch ein weiteres Kriterium zur Beurteilung der Bedeutung des Histamins zur Verfügung zu haben, wurde untersucht, ob sich die Histaminkonzentration im Gewebe bei der Entzündungsentwicklung ändert. Da nach der Applikation von Ricin ein starkes entzündliches Ödem auftritt, welches mehrere Tage bestehen bleibt und dann zur Nekrose führt, konnte der Histamingehalt der Pfotenhaut in diesen Versuchen nicht auf das Feuchtgewicht bezogen werden. Es wird deswegen der Histamingehalt der Pfotenhaut pro Tier angegeben, wobei die Ricininjektion an allen 4 Pfoten der Ratte vorgenommen wurde. Die Ergebnisse der Histaminbestimmungen sind in Tab. 2 enthalten. Aus den Durchschnittswerten sowie den errechneten Streuungen ergibt sich keine signifikante Differenz im Histamingehalt der Pfotenhaut 24 und 48 Std nach der Ricinapplikation gegenüber den Kontrollen. Es ist nicht gelungen, in den Extrakten eine Substanz zu finden, deren Wirkung am Katzenblutdruck nicht mit Pyrilamin zu verhindern war. Folglich muß angenommen werden, daß

bei den Analysen nur Histamin erfaßt wurde. In Tab. 3 ist der Histamingehalt der Pfotenhaut auf das Trockengewicht des Zentrifugates nach der Extraktion bezogen. Auch bei dieser Berechnung ergab sich keine signifikante Veränderung des Histamingehaltes. Die Befunde zeigen, daß Histamin bei der Ricinnekrose nicht in experimentell erfaßbaren Mengen freigesetzt wird. Wahrscheinlich tritt kontinuierlich freies Histamin in geringen Konzentrationen auf, so daß mit der Freisetzung solcher kleinen Mengen die Synthese Schritt halten kann und sich der Gehalt des Gewebes an gebundenem Histamin praktisch nicht ändert.

Tabelle 3. *Histamingehalt der Pfotenhaut verschiedene Zeiten nach Ricinapplikation, bezogen auf das Trockengewicht des Zentrifugates nach der Extraktion*

	Zahl	Haut Feucht-gewicht g	Trocken-gewicht Zentri-fug.	σ	ε	Hist-amin-gehalt γ	σ	ε
Kontrollen	5	1	0,162	0,02	0,01	70,0	19,8	8,9
24 Std nach Ricininjektion . . .	5		0,162			64,0	16,3	7,3
48 Std nach Ricininjektion . .	5		0,162			86,8	25,1	11,2

Diskussion

Die mit den Antihistaminen und Antipyretica erhobenen Befunde stehen im Einklang mit Ergebnissen von Wilhelmi u. Domenjoz aus Untersuchungen über die Wirkung von Pyrazolen (Aminophenazon und Phenylbutazon) und Antihistaminen (Pyrilamin und Synopen) bei verschiedenen Arten experimenteller Entzündung. Am UV-Erythem waren die Pyrazole wirksamer, ebenso im Anfangsstadium der Crotonölentzündung, während sich im späteren, mit starkem Ödem und Nekrosen einhergehenden Stadium der Crotonölentzündung am Kaninchenohr die Pyrazole als schwach oder unwirksam, das geprüfte Antihistaminicum Synopen jedoch als wirksam erwiesen.

Das Anwendungsgebiet der Pyrazole in der Klinik erstreckt sich auf alle Formen rheumatischer Entzündungen. Wenn man auch die experimentelle Ricinentzündung nicht ohne weiteres mit dem Rheumatismus vergleichen kann, so darf man doch annehmen, daß sie beide primär eine Zellschädigung als Ursache haben. Im Experiment beeinflussen die Pyrazole weder die ursächliche Gewebsschädigung noch ihre Folgen. Man kann daraus schließen, daß sich ihre Wirksamkeit auch in der Therapie rheumatischer Entzündungen im wesentlichen auf die Linderung von Symptomen erstreckt, wobei die analgetische und die gefäßabdichtende Wirkung sicher eine Rolle spielt.

Die weitaus eindrucksvolleren Ergebnisse mit dem Histaminliberator Compound 48/80 deuten darauf hin, daß durch die Vorbehandlung mit dieser Substanz die Reaktion des Gewebes auf das schädigende Agens abgeschwächt und damit die Ursache der Entzündungsreaktion beeinflußt wurde. Der Grund der veränderten Reaktion des Gewebes kann nicht allein in der Histaminverarmung gesehen werden. Es muß vielmehr angenommen werden, daß die Wirkung von Compound 48/80 auf anderen

Faktoren beruht. Einen Hinweis geben folgende Befunde: Kürzlich wurde von Bhattacharya u. Lewis festgestellt, daß Compound 48/80 nicht nur Histamin, sondern auch Serotonin freisetzt und diese Serotonin-freisetzung wesentlich langsamer erfolgt. Serotonin verursacht bei lokaler Applikation z. B. an Rattenpfoten wie Histamin ein Ödem, und zwar ist seine diesbezügliche Wirksamkeit nach Benditt u. Rowley 200 mal größer als die des Histamins. Schließlich sind einige Antihistamine, die antiphlogistische Wirkung besitzen, wie Chlorpromazin und Promethazin, auch Serotoninantagonisten. Danach bestünden gute Gründe, auch dem Serotonin eine Bedeutung bei der Entzündungsreaktion zu übertragen. Daß die antiphlogistische Wirkung der Antihistaminica vom Histaminantagonismus unabhängig ist, zeigte Mayer, der einen Zusammenhang dieses Effektes mit der hyaluronidasehemmenden Wirkung nachwies. Gegen eine Bedeutung des Histaminantagonismus spricht in unseren Versuchen die Unwirksamkeit des Diphenhydramins.

Die erhobenen Befunde lassen vermuten, daß es spezifische Antiphlogistica gibt, die den Gewebsstoffwechsel bei der entzündlichen Gewebsreaktion beeinflussen und zu denen Compound 48/80, die untersuchten Phenothiazinderivate und Pyrilamin gehören. Zur Aufklärung des Wirkungsmechanismus muß die Rolle des Serotonins geprüft und der Einfluß der genannten Substanzen auf die Entstehung und Wirkung von „Entzündungsstoffen" (nach Menkin) untersucht werden.

Summary

With 0,5γ Ricin injected subcutaneously into the rat paw necrosis is developed which heals within 28 days.

After pretreatment with two different doses of the histamine liberator Compound 48/80, which are equally effective according to their histamine liberating action the time for recovery is shortened for about 6 days by the smaller dose and for 12 days by the larger one.

The treatment with Promethazin, Chlorpromazin or Pyrilamin shortens remarkably the recovery-time whereas Diphenhydramin and a number of well-known antiphlogistic substances are not effective at all. Cortison increases considerably the time for healing.

The results allow the conclusion that Histamine has no fundamental significance for inflammation caused by Ricin. The antiphlogistic action of antihistaminic compounds is not based on its antihistaminic property. Other possibilities explaining the mechanism of action are discussed.

Literatur

Benditt, E. P., and D. A. Rowley: Science **123**, 24 (1956).

Bhattacharya, B. K., and G. P. Lewis: Brit. J. Pharmacol. **11**, 202, 411 (1956).

Ehrich, W. E.: Die Entzündung. Handbuch der allgemeinen Pathologie, Bd. 7, I. Teil. Springer 1956.

Ehrlich, P.: Dtsch. med. Wschr. **1891**, 976, 1218.
Feldberg, W., and J. Talesnik: J. Physiol. (Lond.) **120**, 550 (1953).
Germuth, F. G. jr.: Pharmacol. Rev. **8**, 1 (1956).
Gollwitzer-Meyer, K., u. A. Bingel: Naunyn-Schmiedeberg's Arch. exp. Path. Pharmak. **173**, 173 (1933).
Haas, H.: Naunyn-Schmiedeberg's Arch. exp. Path. Pharmak. **197**, 161 (1941); **199**, 637, 656 (1942).
Heubner, W.: Naunyn-Schmiedeberg's Arch. exp. Path. Pharmak. **107**, 129 (1925).
Hildebrandt, F.: Naunyn- Schmiedeberg's Arch. exp. Path. Pharmak. **190**, 197 (1938).
Kabat, E. A., M. Heidelberger and A. E. Bezer: J. biol. Chem. **168**, 629 (1947).
Kopera, A., and A. K. Armitage: Brit. J. Pharmacol. **9**, 392 (1954).
Kramer, M.:Naunyn-Schmiedeberg's Arch. exp. Path. Pharmak. **220**, 391 (1953); **228**, 302, 340 (1956).
Last, M. R., and E. R. Loew: J. Pharmacol. exp. Ther. **89**, 81 (1947).
Mayer, R. L.: Ann. N. Y. Acad. Sci. **52**, 1041 (1949).
Menkin, V.: Biochemical Mechanism in Inflammation 2nd Edition. Springfield, Ill.: Charles C. Thomas 1956.
Osborn, Th. B., L. B. Mendel and J. F. Harris: Amer. J. Physiol. **14**, 259 (1905).
Rigdon, R. H.: zit. nach Ehrich, W. E.: „Die Entzündung." Handb. der allgem. Pathologie, Bd. 7, I. Teil. Springer 1956.
Riley, F. F., and G. B. West: J. Path. Bact. **69**, 269 (1955).
Rössle, R.: persönliche Mitteilung. — Klin. Wschr. **1935**, 769.
Schöne, D.: unveröffentlicht.
Selye, H., and A. Horava: Second annual report on Stress Montreal, Acta Inc. Publ. 1952.
Stern, P., A. Nikulin u. M. Ciglar: Naunyn-Schmiedeberg's Arch. exp. Path. Pharmak. **227**, 522 (1956).
Wilhelmi, G., u. R. Domenjoz: Naunyn-Schmiedeberg's Arch. exp. Path. Pharmak.**212**, 125 (1950).

Dr. M. Kramer, Soc. Ital. Prodotti Schering, Laboratorio Farmacologico, Via L. Mancinelli 7, Mailand

Arch. exper. Path. u. Pharmakol., Bd. 233, S. 134—138 (1958)

Aus dem Pharmakologischen Institut der Freien Universität Berlin

Bestimmung des extracellulären Raumes von Ratten mit Hilfe von Inulin

Von
J. Schaper und G. Senft

Mit 1 Textabbildung

(Eingegangen am 25. Oktober 1957)

Die mit verschiedenen Methoden durchgeführten Bestimmungen des extracellulären Raumes haben bisher nicht zur Gewinnung übereinstimmender Resultate geführt. Aus dem Chloridgehalt des Hundeskeletmuskels haben Hastings u. Eichelberger (1937) den extracellulären Anteil mit durchschnittlich 17% des Körpergewichtes errechnet. Sie gingen von der Hypothese aus, daß das Chlorion ausschließlich extracellulär verteilt sei. Diese Annahme wurde durch die Untersuchungen von Manery u. Hastings (1939) und Wilde (1945) widerlegt, die nachwiesen, daß Chlorionen auch in die Zellen eindringen. Erst 1950 konnten Gaudino, Schwartz u. Levitt, die Inulin zur Messung erstmalig benutzten, reproduzierbare Werte über den Umfang des extracellulären Raumes angeben. Dieser beträgt beim Menschen etwa 15—16%, beim Hund 19—20% des Körpergewichtes.

Die Größe des extracellulären Raumes läßt sich aus dem Verteilungsgrad einer (körperfremden) Testsubstanz errechnen, die nicht in die Zellen eindringt.

Von derartigen Testsubstanzen wird verlangt (Gaudino u. Levitt 1949):

1. schnelle und gleichmäßige Verteilung in der extracellulären Phase,
2. keine Umwandlung oder Zerstörung im Organismus,
3. keine osmotische Wirksamkeit und damit verbundene Flüssigkeitsverschiebungen,
4. geringe Toxicität,
5. langsame Elimination aus dem Körper,
6. einfache und genaue Bestimmungsmethoden.

Es gibt heute keine Substanz, die alle hier angeführten Bedingungen vollständig erfüllt. Die früher vielfach benutzten niedermolekularen Stoffe (Br^{82}, Cl^{38}, Thiosulfat, Thiocyanat u. a.) sind zwar leicht diffusibel und verteilen sich relativ schnell im extracellulären Raum. Sie werden aber in Stoffwechselvorgänge mit einbezogen und rasch mit dem Harn ausgeschieden, in höheren Dosen sind sie teilweise toxisch (Thiocyanat). Vor allem aber dringen sie, wie man jetzt weiß, mehr oder

weniger in die Zelle ein, überschreiten also die Grenzen des wahren extracellulären Raumes.

Demgegenüber bieten die höhermolekularen Stoffe (Mannit, Inulin) gewisse Vorteile. Sie sind nicht toxisch und dringen nicht in die Zellen ein. Inulin als bisher beste unter den erwähnten Substanzen ist darüber hinaus in den verwendeten Konzentrationen osmotisch unwirksam und unterliegt im Organismus keinerlei Veränderungen. Ein Nachteil ist, daß sich Inulin nur sehr langsam im extracellulären Raum verteilt und, da es ausschließlich glomerulär filtriert wird, sehr schnell wieder mit dem Urin ausgeschieden wird. Diese unerwünschte Eigenschaft läßt sich durch eine i.v. Dauerinfusion bis zur Einstellung eines Fließgleichgewichtes zwischen infundierter und ausgeschiedener Inulinmenge umgehen. Nach Beendigung der Infusion wird eine Blutentnahme durchgeführt, der Urin gesammelt, um die gesamte zum Zeitpunkt der Blutentnahme im Körper vorhandene Inulinmenge zu gewinnen. Zwischen der Größe des extracellulären Raumes, Plasmakonzentration und der im Urin ausgeschiedenen Inulinmenge besteht folgende Beziehung:

$$\text{Extracellulärer Raum (in Milliliter)} = \frac{\text{ausgeschiedene Menge (in mg)}}{\text{Plasmakonzentration (in mg/ml)}}$$

Inulin ist ein Fadenmolekül mit einem Molekulargewicht von 5000. Es setzt sich aus Fructose-Einzelmolekülen zusammen, welche man durch Spaltung des Inulins nach Erhitzen mit konzentrierter Säure erhält. Die verschiedenen Nachweismethoden des Inulins beruhen auf der Eigenschaft der Fructose, mit aromatischen Verbindungen, z. B. Resorcin, farbige Komplexe zu bilden. Auf dieser Farbstoffbildung sind auch die quantitativen Bestimmungsmethoden des Inulins aufgebaut.

Für unsere Untersuchungen benutzten wir eine einfache und relativ genaue Nachweismethode, die von Roe, Epstein u. Goldstein (1949) angegeben wurde.

Methodik

Reagentien

1. Resorcin-Thioharnstoff-Reagens: 100 mg Resorcin werden mit 250 mg Thioharnstoff in 100 ml Eisessig gelöst. Das Reagens wird in einer braunen Flasche aufbewahrt. (Der Thioharnstoff schützt das Resorcin vor Oxydation durch den Luftsauerstoff.)

2. 30%ige HCl (einem Teil aqua dest. werden 5 Teile konz. Salzsäure, spez. Gewicht 1,19, hinzugefügt).

3. Inulin puriss. (Merck). Zur Herstellung einer Eichkurve wurden 0,5 bis 5 mg-%ige Lösungen hergestellt.

4. Reagentien zur Enteiweisung nach Somogyi. a) 10%ige Lösung von $ZnSO_4 \cdot 7\,H_2O$. b) 0,5 n NaOH.

Diese Lösungen sollen einander genau, Volumen für Volumen, neutralisieren.

Arbeitsgang

1. Eichlösungen. 2 ml der jeweiligen Inulinlösung, 1 ml Resorcin-Thioharnstoff-Reagens und 7 ml 30%ige HCl werden in ein Reagensglas gegeben, umgeschüttelt und für 10 min in ein Wasserbad von 80° C gesetzt, anschließend etwa 5 min in kaltem Wasser auf Zimmertemperatur abgekühlt. Die Colorimetrie wird mit einem Beckman-Spektrophotometer Modell DU bei einer Wellenlänge von 520 mμ

durchgeführt. Für die Vergleichslösung werden die 2 ml der Inulinlösung durch das gleiche Volumen destillierten Wassers ersetzt.

2. Plasma. Zur Enteiweißung werden einem Teil Plasma 15 Teile destilliertes Wasser, 2 Teile Zinksulfat, sowie 2 Teile 0,5 n NaOH zugefügt. (Bei der anschließenden Filtration muß ein Filter verwendet werden, der keine Substanzen enthält, die sich in ihren chemischen Reaktionen wie Inulin verhalten.)

3. Der *Urin* wird wie das Plasma enteiweißt. Da die Inulinkonzentrationen im Urin relativ hoch sind, empfiehlt es sich, das Filtrat mit destilliertem Wasser zu verdünnen.

4. Plasma und Urin-Blankwerte. Während der Urin-Blankwert (= Leerwert) praktisch so gering ist, daß er vernachlässigt werden kann, muß der Plasma-Blankwert jeweils vor Beginn der Inulin-Dauerinfusion bestimmt werden. Er ist im wesentlichen durch den Glucosegehalt des Plasmas bedingt. Glucose gibt wie Fructose mit Resorcin ebenfalls eine Rotfärbung, deren Intensität jedoch 12,5mal geringer ist.

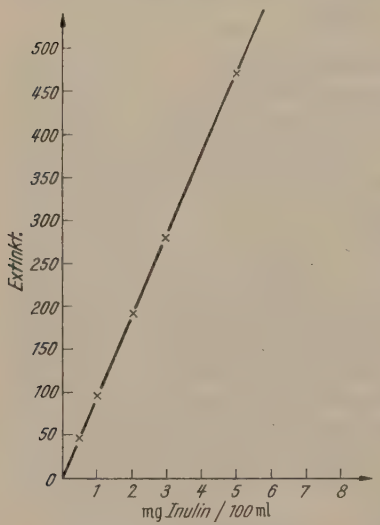


Abb. 1. Beschreibung siehe Text

Die Inulin-Eichkurve verläuft linear. Bei gleichbleibender Schichtdicke der Cuvette ist die Farbintensität dem Inulingehalt direkt proportional (Abb. 1).

Zu Beginn der Versuche wurden Ratten mit einem Gewicht von 200 bis 300 g in Einzelkäfige aus Plexiglas gesetzt, die ein getrenntes Auffangen von Stuhl und Urin der Tiere gestatten [Herken, Senft u. Wilutzky (1956)]. Eine Injektionsnadel Nr. 18 wurde in die Schwanzvene eingeführt und mit Leukoplast befestigt. Zur Vermeidung einer Blutgerinnung wurden etwa 0,2 ml einer 0,7%igen Lösung von polyäthylensulfosaurem Natrium in die Vene injiziert und die Kanüle an eine Infusionspumpe angeschlossen. Infundiert wurde jeweils eine frisch zubereitete 1%ige Inulinlösung (100 mg Inulin album puriss. Merck in 10 ml physiol. NaCl-Lösung). Die Infusionsgeschwindigkeit betrug 2 ml/Std, die Infusionsdauer 5 Std. Insgesamt wurden 10 ml Lösung bzw. 100 mg Inulin injiziert. In dieser Zeit schieden die Tiere durchschnittlich 6,2 ml Urin aus. Berücksichtigt man den extrarenalen Flüssigkeitsverlust, der unter diesen Bedingungen 0,7 ml pro Stunde beträgt, so ergibt sich eine Flüssigkeitsgesamtausscheidung von 9,7 ml, die fast genau der Flüssigkeitseinfuhr entspricht. Die Flüssigkeitsbilanz wird durch die Dauerinfusion nicht verändert.

Nach Beendigung der Infusion wurde bei den Tieren eine lokale Anaesthesie der Cornea mit einer 1%igen Cocainlösung durchgeführt. Anschließend wurden die

Ratten aus dem Käfig entfernt und ihre Harnblasen durch leichten Druck oberhalb der Symphyse exprimiert. Die Blutentnahme erfolgte aus dem retrobulbären Venenplexus nach einer von Nöller (1953) beschriebenen Technik. Die Ratten werden mit dem Zeigefinger und Daumen der linken Hand zwischen Kopf und Schultergürtel fest fixiert. Ein geringer mit dem Daumen und dem Zeigefinger der linken Hand auf den Hals des Tieres ausgeübter Druck erzeugt eine leichte venöse Stauung im Tierkopf mit Füllung der retrobulbären Venen. Die rechte Hand führt eine Capillarpipette, deren Öffnung einen Innendurchmesser von 0,6 mm bei einer Glaswandstärke von 0,3 mm besitzt, in den inneren Lidwinkel eines Auges ein und durchstößt unter Rotation der Pipette die Tenonsche Kapsel. Die Pipettenspitze eröffnet in 4—5 mm Tiefe den angestauten retrobulbären Venenplexus. Bei einiger Übung

Tabelle 1. *Bestimmung der Größe des extracellulären Raumes (ECR) von Ratten mit Inulin*

Tier	Gewicht in g	Inulinmenge (mg)	Plasma-konzentration (mg/ml)	ECR (ml)	ECR in Prozent des Körpergewichtes
1	235	8,7	0,19	44	18,6
2	340	8,7	0,102	85	25,0
3	240	6,6	0,115	57	23,8
4	205	6,6	0,165	40	19,5
5	195	6,5	0,138	46	23,6
6	205	4,4	0,114	38,4	18,7
7	200	8,1	0,224	37	18,5
8	210	13,2	0,35	38	18,1
9	245	7,7	0,16	48	19,6
10	215	4,8	0,098	49	22,8
11	255	8,4	0,143	59	23,0
12	245	5,5	0,107	51	20,8
13	230	4,2	0,098	43	18,7
14	260	8,9	0,13	68	26,0
15	255	7,5	0,176	44	17,3
					$m = 20{,}9$ $\sigma \pm 2{,}8$

gelingt es meist, etwa 1—2 ml Blut zu gewinnen. Unmittelbar nach der Blutentnahme erhalten die Tiere 5 ml einer physiologischen Salzlösung durch eine Magensonde, werden wieder in die Plexiglaskäfige gesetzt und darin für etwa 20 Std belassen. Während dieses Zeitraumes scheiden sie die zum Zeitpunkt der Blutentnahme im Organismus vorhandene Inulinmenge vollständig aus.

Die Versuche wurden an 15 männlichen Tieren durchgeführt. Die Ergebnisse sind in der Tab. 1 aufgeführt. Die Größe des extracellulären Raumes der Ratte beträgt im Mittel 20,9% des Körpergewichtes. Sie entspricht der Größe des extracellulären Raumes des Hundes, der von Gaudino u. Levitt mit 19,4% des Körpergewichtes angegeben wird. Prinzipiell gleiche Resultate erhielten vor kurzem Cheek, West u. Carter Golden (1957), die den extracellulären Raum von Ratten aus der Natrium- und Chloridverteilung berechneten. Die Möglichkeit, den extracellulären Raum von Ratten serienmäßig zu bestimmen, wird dazu

beitragen, genauere Einblicke in den Wasser- und Mineralhaushalt dieser häufig benutzten Laboratoriumstiere zu gewinnen, die für das Studium der experimentellen Ödeme notwendig sind.

Summary

A method has been described which permits the use of inulin as a measure of the extracellular space of rats, by means of an equilibrating infusion followed by the collection of the total inulin excreted. The blood used for the measuring of inulin plasma concentration is taken from the retroorbital vein plexus. The average extracellular space of the rat is 20,9 per cent of the body weight.

Literatur

Cheek, D. B., C. D. West and C. Carter Golden: J. Clin. Invest. **36**, 340 (1957).

Gaudino, M., I. L. Schwartz and M. F. Levitt: Proc. Soc. Exper. Biol. a. Med. **68**, 507 (1948).

Gaudino, M., and M. F. Levitt: Amer. J. Physiol. **157**, 387 (1949).

Hastings, A., and L. Eichelberger: J. of Biol. Chem. **117**, 73 (1937).

Herken, H., G. Senft u. H. Wilutzky: Arch. exper. Path. u. Pharmakol. **229**, 123 (1956).

Manery, J. F., and A. B. Hastings: J. of Biol. Chem. **127**, 657 (1939).

Nöller, H. G.: Klin. Wschr. **1955**, 770.

Roe, J. H., J. H. Epstein and N. P. Goldstein: J. of Biol. Chem. **178**, 839 (1949).

Somogyi, M.: J. of Biol. Chem. **86**, 655 (1930).

Wilde, W. S.: Amer. J. Physiol. **143**, 666 (1945).

Dr. G. Senft, Pharmakologisches Institut der Freien Universität Berlin-Dahlem, Thielallee 69/73

Arch. exper. Path. u. Pharmakol., Bd. 233, S. 139—150 (1958)

Aus dem Pharmakologischen Institut der Freien Universität Berlin

Der Einfluß von Äthionin und anderen Lebergiften auf Fermentsysteme der Lebermikrosomen

Von

H. Herken, D. Maibauer und D. Neubert

Mit 5 Textabbildungen

(Eingegangen am 21. Oktober 1957)

Das Studium der Abbauvorgänge bestimmter Pharmaka im tierischen Organismus hat zu der Entdeckung von Fermentsystemen geführt, die in den Lebermikrosomen lokalisiert sind. Diese Enzyme — im folgenden kurz „Mikrosomenfermente" genannt — besitzen pharmakologische Bedeutung, da ein großer Teil von körper*fremden* Substanzen oxydativ durch dieses System umgesetzt werden kann. Bisher ist noch kein körper*eigner* Stoff bekannt, der diesen Fermenten als Substrat dient.

Ausgangspunkt dieser Arbeiten war die Untersuchung von Phenylessigsäurederivaten: des SKF 525-A[1] von Cook, Toner u. Fellows (1954) und des CFT 1201[2] von Herken u. Mitarb. (1955, 1956), mit denen ganz eindeutige Wirkungsverlängerungen einiger Pharmaka im Tierexperiment hervorgerufen werden konnten. Alle Substanzen, bei denen eine derartige Wirkungsverlängerung zu erzielen war, erleiden im Organismus eine schnelle Umwandlung. Es konnte gezeigt werden, daß die Wirkung der Phenylessigsäurederivate auf einer Hemmung der für den Abbau wichtigen Fermentsysteme in den Lebermikrosomen beruht (Axelrod, Reichenthal u. Brodie 1954, Cooper u. Brodie 1955).

Bei der Ratte weisen die Mikrosomenfermente beider Geschlechter einen beträchtlichen Aktivitätsunterschied auf; die Enzyme männlicher Tiere sind aktiver. Bei der Vergiftung mit Äthionin, einem Antimetaboliten des Methionins, auf den wir durch die histologischen Untersuchungen im Institut von W. Doerr (1953) aufmerksam wurden, ist ein in mancher Beziehung ähnliches geschlechtsspezifisches Verhalten bekannt (Farber, Koch-Weeser u. Popper 1951, Farber u. Segaloff 1955). Äthionin bewirkt neben ausgedehnten Veränderungen in einigen Organen (Pankreas, Hoden usw.) eine diffuse, feinsttropfige Leberverfettung.

Es ist auffällig, daß männliche Tiere bei der akuten Vergiftung eine wesentlich geringere Verfettung aufweisen; auch die Toxicität des Äthionins ist bei ihnen herabgesetzt. Daraus ergab sich die Frage, ob die Aktivität der Mikrosomenfermente eine Rolle bei dem Verlauf der Äthioninvergiftung spielt. Zum Vergleich wurde auch die Wirkung der Lebergifte Tetrachlorkohlenstoff, gelber Phosphor und Allylalkohol auf die Mikrosomenfermente geprüft.

[1] Diphenylpropylessigsäurediäthylaminoäthanolester.

[2] Phenyldiallylessigsäurediäthylaminoäthanolester (hergestellt von Dr. Pflugk, Chemische Fabrik Berlin-Tempelhof).

Methodik

Als Versuchstiere dienten Albinoratten beiderlei Geschlechts im Gewicht von 180—200 g. Die Nahrung bestand aus einem standardisierten Preßfutter und Wasser ad libitum. Bei den akuten Versuchen wurde das Futter jeweils am Vorabend abgesetzt. d,l-Äthionin gaben wir den Ratten bei den *akuten* Experimenten in einer 2%igen wäßrigen Lösung in der Dosierung von 750 mg/kg oral mit der Schlundsonde. Zur Erreichung einer hohen Anfangskonzentration erhielten die Tiere am ersten Tag der *chronischen* Äthioninfütterung 750 mg/kg des Stoffes in 3 Dosen mit zweistündigem Abstand. An den folgenden Tagen wurden dann je einmal 250 mg/kg in der gleichen Weise appliziert.

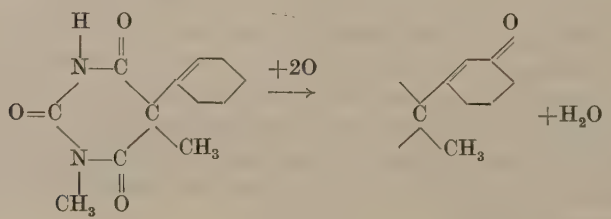
Eine Schädigung der Leber wurde durch Tetrachlorkohlenstoff (3 ml CCl_4/kg 15—18 Std vor Versuchsbeginn subcutan) bzw. durch gelben Phosphor (2 Tage lang 1 mal täglich in Form von 0,1—0,2 ml der 1%igen öligen Lösung auf die Zunge geträufelt) erzielt. Allylalkohol erhielten die Tiere in Form von 0,2 ml der 2%igen wäßrigen Lösung 15 Std vor Versuchsbeginn oral durch die Schlundsonde.

S-Äthylcystein wurde in einer Menge von 1,6 g/kg in wäßriger Lösung oral gegeben.

Die Bestimmung der Schlafdauer erfolgte in einem ruhigen, abgedunkelten und warmen Raum. Als Schlafdauer wurde die Zeit vom Verschwinden bis zur Wiederkehr der Stellreflexe registriert. Evipan (100 mg/kg) wurde intraperitoneal, Veronal (215 mg/kg) subcutan, beides in wäßriger Lösung verabreicht.

Die Untersuchung der Aktivität der Lebermikrosomen erfolgte an männlichen Ratten. Die Tiere wurden durch Dekapitation getötet, die Leber nach dem Ausbluten schnell herausgenommen, durch ein Perlonsieb gerührt und in einem Homogenisator nach Potter-Elvehjem (Plexiglas) in m/15 Phosphatpuffer nach Sörensen vom p_H 7,4 homogenisiert. Das Verhältnis von Leberfeuchtgewicht zur Puffermenge betrug 1:1,5. Durch zweimaliges Zentrifugieren bei 9000 × g wurden die intakten Zellen, Zellkerne, Mitochondrien und Erythrocyten abgetrennt und die sogenannte „supernatant fraction", welche aus den Mikrosomen und dem Zellplasma bestand, gewonnen. Sämtliche Arbeitsgänge wurden bei einer Temperatur von 2—4° C im Kühlraum vorgenommen; das Zentrifugieren erfolgte bei etwa der gleichen Temperatur in einer schnellaufenden, gekühlten Zentrifuge (Eispirouette der Fa. Phywe). Die bei einigen Versuchen durchgeführte Trennung von Mikrosomen und Zellplasma erfolgte in einer Ultrazentrifuge (Fa. Phywe) bei 180000 g[1]. Hierbei mußte eine kurzfristige Erwärmung des Homogenates bis auf höchstens 10° C in Kauf genommen werden. Als Test für die Aktivität wählten wir zwei typische Reaktionen aus:

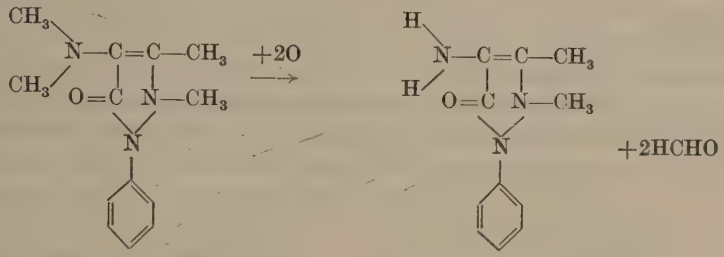
Oxydation von Evipan



Evipan

[1] Herrn Diplom-Chemiker G. Kurth (Org.-Chem. Inst. der Freien Universität Berlin) danken wir für die Hilfe bei den Versuchen mit der Ultrazentrifuge.

N-Demethylierung von Pyramidon



Pyramidon 4-Amino-Antipyrin

1. die Seitenkettenoxydation des Evipans,
2. die N-Demethylierung des Pyramidons.

Der Ansatz zum Nachweis des Abbaus der untersuchten Pharmaka hatte folgende Zusammensetzung:

3 ml Fermentlösung (Mikrosomen in Leberzellplasma)
1 ml Substratlösung (500 γ Substrat/ml Phosphatpuffer)
1 ml Phosphatpuffer p_H 7,4 mit Zusätzen
5 ml

Die Zusätze bestanden aus:

5 mg $MgCl_2 \cdot 6\ H_2O$
12 mg Nicotinsäureamid
10 mg Glucose
750 γ TPN (Handelspräparat der Fa. Sigma Chemical Company, St. Louis)

} im ml Phosphatpuffer

Inkubationszeit bei Evipan 1 Std, bei Pyramidon 2 Std. Gasphase: Luft. Inkubationstemperatur 37° C. Der Sauerstoffverbrauch der Ansätze war gering. Die Inkubation erfolgte in der Apparatur nach Warburg.

Den Abbau des Evipans bestimmten wir durch spektrophotometrische Messung der verbleibenden, nicht veränderten Substanz nach Extraktion mit Petroläther. Wir benutzten die Methode von Brodie et al. (1953) in der von Remmer (1957a) angegebenen Modifikation. Der Nachweis des Pyramidon-Abbaus wurde durch Bestimmung des entstehenden 4-Amino-Antipyrins geführt. Zu diesem Zweck wurde das Reaktionsgemisch mit Trichloressigsäure (Endkonzentration 6%) enteiweißt, filtriert, diazotiert und mit α-Naphthol gekoppelt. Die Messung der Extinktion der stark natronalkalischen Lösung erfolgte bei 480 mμ im Beckman-Spektrophotometer. Die Eichkurve verlief innerhalb des benutzten Bereichs linear.

Ergebnisse und Diskussion

Das erste Ergebnis der angestellten Untersuchung war, daß die Blockade der Mikrosomenfermente durch den Phenyldiallylessigsäureester des Diäthylaminoäthanols (CFT 1201) die Toxicität des Äthionins nicht verändert. Abb. 1 demonstriert die höhere Giftigkeit dieser Aminosäure für weibliche Tiere, die unter den Versuchsbedingungen größtenteils abstarben, während die Männchen alle überlebten. Wenn die Mikrosomenfermente bei der Entgiftung des Äthionins eine Rolle spielten,

hätte man erwarten können, daß die mit CFT 1201 behandelten Männchen sich wie die Weibchen verhalten, d. h. ebenfalls eine höhere Absterbequote aufweisen. Man darf also annehmen, daß bei der akuten Äthioninvergiftung der Unterschied in der Wirkung gleicher Dosen bei beiden Geschlechtern nicht durch den verschieden schnellen Abbau des Äthionins (etwa durch Deäthylierung) zustande kommt, sondern auf anderen Stoffwechselunterschieden zwischen der männlichen und weiblichen Ratte beruht. Es sind Anhaltspunkte dafür vorhanden, daß diese Differenz zwischen den Geschlechtern im Steroidstoffwechsel begründet ist (Remmer 1957b).

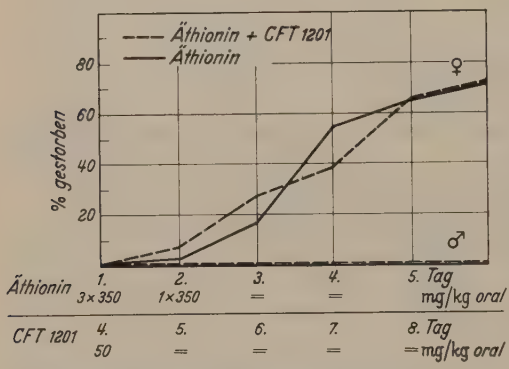


Abb. 1. Toxicität von Äthionin bei männlichen und weiblichen Ratten. Gleichzeitige Behandlung mit CFT 1201 hat keine Wirkung. Siehe Text. Tierzahl: 28 Tiere pro Gruppe

Obwohl eine Beteiligung der Mikrosomenfermente bei der Entgiftung des Äthionins unter den geschilderten Bedingungen nicht nachgewiesen werden konnte, zeigte sich, daß umgekehrt die Aktivität dieses Enzymsystems bei der Äthioninvergiftung beeinflußt wird. Die Wirkungsdauer von Evipan, dessen Abbau durch dieses Enzymsystem sehr rasch vor sich geht, wird in vivo bei äthioninvergifteten Tieren stark verlängert. Auch hier sind wieder die schon erwähnten Geschlechtsunterschiede zu beobachten: bei der akuten Äthioninvergiftung trat bei mg/kg) ei Tieren bereits 24 Std nach Beginn der Äthioningaben (3×250 derartigerne deutliche Schlafverlängerung auf. Bei Männchen war ein weiblichen Effekt nicht zu beobachten. Es ist auffällig, daß die Leber der weiblichen Tiere zu diesem Zeitpunkt bereits stark verfettet war, während die der männlichen Tiere wenig oder gar keine Veränderungen aufwies. Erst nach einer Äthioninbehandlung von mehreren Tagen, die auch bei männlichen Tieren eine Leberverfettung hervorruft, war bei den Männchen eine Verlängerung des Evipanschlafes zu beobachten.

Die Frage, ob diese schlafverlängernde Wirkung auf einer Aktivitätsverminderung der Fermente in den Lebermikrosomen beruht, wurde in ähnlichen Versuchen mit Veronal, das bekanntlich im intermediären Stoffwechsel kaum Veränderungen erleidet (Goldschmidt u. Wehr 1957), zu entscheiden versucht. Es zeigte sich, daß hier keine Änderung der Schlafzeit bei den äthioninbehandelten Tieren gegenüber den Kontrollen zu bemerken war, obwohl das Äthionin 11 Tage lang gegeben

wurde. Die Ergebnisse dieser Versuche sind in der Abb. 2 zusammengefaßt.

Nachdem das Vorliegen einer Schädigung der entgiftenden Funktion der Leber durch Änderung der Schlafdauer nachgewiesen werden konnte, wurden die Mikrosomen normaler und vergifteter Tiere zur genaueren Charakterisierung des Angriffspunktes isoliert und auf ihre Fähigkeit, Evipan oder Pyramidon in vitro abzubauen, geprüft.

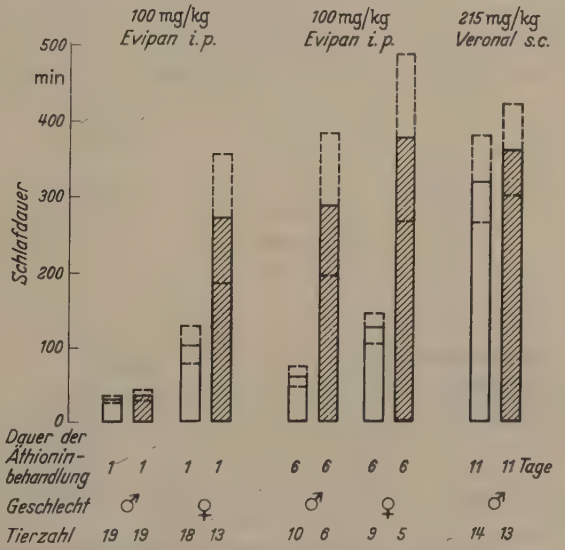


Abb. 2. Schlafdauer bei akuter und chronischer Äthioninvergiftung. ☐ Kontrollen; ▨ Äthionin

Es ist seit längerer Zeit bekannt, daß männliche und weibliche Ratten nach Gabe gleicher Dosen Evipan oder ähnlich wirkender Barbiturate verschieden lange schlafen (Nicholas u. Barron 1932, Holck et al. 1937). In Analogie zu diesem Verhalten konnte Axelrod (1956) bei der Untersuchung des Abbaus einiger Analgetica zeigen, daß auch die Mikrosomenfermente männlicher Tiere in vitro eine höhere Aktivität aufweisen als die weiblicher Ratten. Da ein gleichartiges Verhalten auch bei der Prüfung des Evipanabbaus in vitro nachzuweisen war (Tab. 1), haben wir unsere Untersuchungen nur an männlichen Ratten durchgeführt.

Schwierigkeiten bereitete die Wahl eines geeigneten Bezugsystems. Eine Beziehung auf den N-Gehalt erscheint, besonders bei äthioninvergifteten Tieren, nicht sehr günstig, da Veränderungen im N-Stoffwechsel bei der Äthioninvergiftung bekannt sind, und damit eine Variation des Verhältnisses von N zum Mikrosomengewicht nicht ausgeschlossen werden kann (Wu u. Bollmann 1954, Wu 1955, Levy et al. 1955). Aus diesem Grunde haben wir auf den Stickstoff als Bezugsgröße verzichtet und uns aus versuchstechnischen Gründen für das Feuchtgewicht

entschieden. Wir hielten dies für statthaft, da die Gewichte auch der verfetteten Organe im akuten Versuch vom Kontrollwert um höchstens ± 10% abweichen. Diese Streuung stellt die Fehlerbreite unserer Methode dar. Da bei längerdauernder Äthioninbehandlung die Ratten stark an Gewicht verloren und sich dementsprechend auch das Lebergewicht verringerte (im Extremfalle auf 50%), wurde bei der Aufarbeitung der Organe darauf geachtet, daß immer die gleiche Menge Leber in der gleichen Menge Phosphatpuffer homogenisiert wurde.

Tabelle 1. *Unterschied zwischen der Aktivität der Mikrosomenfermente männlicher und weiblicher Ratten*
Vorgelegt 500 γ Evipan-Na. Zahlen: abgebaute Evipanmenge in Mikrogramm Methodik siehe Text

Exper. Nr.	weibliche Ratten	männliche Ratten
1	80	325
2	65	435
3	49	320
4	80	355
5	44	425
6	49	
Mittelwert:	61	380
in Prozent der vorgelegten Evipanmenge:	12%	76%

Tabelle 2. *Wirkungslosigkeit von Äthionin in vitro*
Vorgelegt 500 γ Evipan-Na. Zahlen: abgebaute Evipanmenge in Mikrogramm. Methodik siehe Text

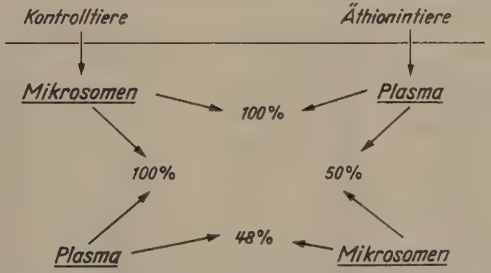
Exper. Nr.	Kontrolle	10^{-2}m d,l-Äthionin
1	115	103
2	105	128
3	90	
Mittelwert:	103	115

Nach Einwirkung von Äthionin erleidet das Vermögen der Mikrosomenfermente, Evipan und Pyramidon in vitro abzubauen, erheblichen Schaden (Abb. 3 u. 5). Die Aktivität — gemessen an der umgesetzten Substratmenge — ist nach 4—6tägiger Äthioninbehandlung bis auf 10 bis 15% der Kontrollwerte gesunken. Nach längerdauernder Applikation des Äthionins (35 Tage) geht die Schädigung teilweise zurück, so daß der Wirkungsverlust nur etwa 50% beträgt.

Der von uns beobachtete Effekt des Äthionins an den Mikrosomenfermenten ist nur nach der Applikation des Stoffes in *vivo* zu beobachten. Ein Zusatz von Äthionin — auch in einer Konzentration von 10^{-2} m — hat in vitro keinen Einfluß auf den Evipanabbau (Tab. 2).

Es ist bekannt, daß die Mikrosomenfermente zu einer optimalen Aktivität eine Reihe von Zusätzen benötigen. Dieses ist neben $MgCl_2$ und Nicotinsäureamid in erster Linie das TPN-H_2. Da TPN-H_2 unbeständig ist, kann das Coferment dem Versuchsansatz nur in Form des TPN zugesetzt werden. Es muß dafür gesorgt werden, daß durch eine geeignete Reaktion laufend TPN zum notwendigen TPN-H_2 reduziert wird. Hierzu sind z. B. im Zellplasma lokalisierte Fermente des Sedoheptulose-Cyclus, wie die Glucose-6-Phosphat-Dehydrogenase, notwendig. Wir haben aus diesem Grunde unsere Untersuchungen nicht mit isolierten Mikrosomen durchgeführt, sondern mit der sogenannten „supernatant fraction", d. h. mit Mikrosomen, die im Zellplasma aufgeschwemmt sind.

Es mußte jetzt noch nachgewiesen werden, daß die Schädigung durch das Äthionin unter den geschilderten Versuchsbedingungen tatsächlich



Schema des Kreuzversuches mit reinen Mikrosomen und mikrosomenfreiem Zellplasma. Die Äthioninschädigung greift an den Mikrosomen an. (Siehe Text). Trennung der Mikrosomen- und Plasmafraktionen in der Ultrazentrifuge bei 180000 × g. Pyramidon-Abbau der Kontrolltiere = 100%. Vorgelegte Menge Pyramidon 500 γ. Äthionindosis: 250 mg/kg/Tag. Dauer der Äthioninbehandlung 6 Tage

an den Mikrosomen und nicht an den Enzymsystemen im Zellplasma angreift, die zur Bildung des notwendigen TPN-H_2 benötigt werden. Das Ergebnis von Kreuzversuchen, bei denen die Mikrosomen von äthioningeschädigten Lebern nach Abtrennung in der Ultrazentrifuge im (mikrosomenfreien) Zellplasma normaler Lebern aufgeschwemmt wurden und umgekehrt, zeigt, daß die Schädigung zumindest bei dieser Vergiftung tatsächlich das erfaßbare Substrat der Mikrosomen trifft (Schema).

Zur Frage der Spezifität der Äthioninwirkung wurden auch Versuche mit einer analog konfigurierten Aminosäure, deren Kohlenstoffkette um ein C-Atom kürzer ist als die des Äthionins, nämlich dem S-Äthyl-Cystein, durchgeführt. Es stellte sich heraus, daß diese Substanz selbst bei massiver Dosierung kaum eine Wirkung zeigte. Bei chronischer Applikation von täglich 1,6 g/kg waren — abgesehen von einer gegenüber den Kontrollen etwas verringerten Gewichtszunahme — keine toxischen Erscheinungen erkennbar. Auch die Aktivität der Mikrosomenfermente war völlig normal (Abb. 3).

Der Wirkungsmechanismus des Äthionins, das 1938 von Dyer erstmalig untersucht wurde, ist auch heute noch nicht geklärt. Bekannt ist eigentlich nur, daß es durch Verdrängung der essentiellen Aminosäure Methionin wirkt. Welche

Stoffwechselvorgänge dabei jedoch vorwiegend getroffen werden und welche Störungen den ausgedehnten morphologischen Veränderungen, die sowohl bei der akuten als auch bei der chronischen Äthioninvergiftung beobachtet werden, zugrunde liegen, konnte zunächst nur vermutet werden. Die Ergebnisse einer großen Zahl von Publikationen über dieses Thema hat vor kurzem V. Becker (1957) in einer Übersicht veröffentlicht. So wurde z. B. als Erklärung der Äthioninwirkung ein Einbau dieser Aminosäure anstelle des Methionins in die Eiweißkörper angenommen, wodurch es zur Bildung „abnormer", also funktionsgestörter Proteinmoleküle kommen sollte (Levine u. Tarver 1951, Gross u. Tarver 1955). Obwohl mit radioaktiven Isotopen gearbeitet wurde, erscheinen die dieser Hypothese zugrunde liegenden Experimente nicht sehr beweiskräftig, da eine Reindarstellung der Proteine nicht gelang und demzufolge eine Adsorption aktiver Substanzen an die Proteine nicht sicher ausgeschlossen werden konnte. Außerdem ist eine derartige

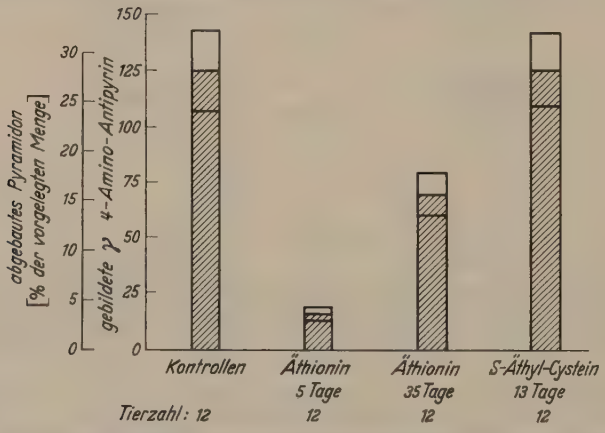


Abb. 3. Aktivität der Mikrosomenfermente bei der Äthioninvergiftung gemessen am Pyramidon-Abbau

Annahme unwahrscheinlich, da kaum anzunehmen ist, daß die außerordentlich spezifische Zusammensetzung der Eiweißkörper durch den Einbau von d (!) und l-Äthionin in geicher Weise gestört werden können. Auch einen Einbau des Äthionins in Nucleotide glauben Schlenk u. Tillotson (1954) bei Mikroorganismen nachgewiesen zu haben. Da dem Methionin außer seiner Eigenschaft als Proteinbaustein eine wichtige Rolle bei Transmethylierungsvorgängen im intermediären Stoffwechsel zukommt, kann eine Störung dieser Funktion ebenfalls den zu beobachtenden Veränderungen zugrunde liegen. So konnten Stekol u. Weiss (1950) eine Übertragung der Äthylgruppe des Äthionins wahrscheinlich machen. Es soll dabei zur Bildung von äthylsubstituierten Analoga des Cholins und Kreatins kommen. Obgleich bei der Äthioninvergiftung an anderen Organen, wie dem Pankreas und den Hoden, ausgedehnte Veränderungen zu beobachten sind, hat uns in erster Linie die Leberschädigung interessiert, weil hier die geschlechtsgebundenen Unterschiede am deutlichsten sind.

Das Auftreten der Verfettung ist nicht als spezifischer Effekt des Äthionins zu werten. Ganz allgemein wurden Leberverfettungen bei einem Mangel an einzelnen Aminosäuren beobachtet (Scott 1954, 1956, Sidransky u. Farber 1957, Singal et al. 1953). Auch ist bekannt, daß der Hunger das Auftreten einer Leberverfettung begünstigt (Statkewitsch 1894, Schlicht 1955). Es kann daher nicht ausgeschlossen werden, daß diese Faktoren auch bei der Leberverfettung durch Äthionin

eine Rolle spielen, da die Nahrungsaufnahme der Tiere während der Äthioninvergiftung sicherlich verringert ist.

Becker (1956) machte die Beobachtung, daß die ursprünglich starke Leberverfettung nach etwa 14 Tagen sehr schnell zurückgeht und nach dieser Zeit nur noch eine histiocytäre Infiltration der Leber histologisch zu erkennen ist. Auch die sehr schwer geschädigten und zum größten Teil untergegangenen Pankreas-Acini beginnen sich nach einem Zeitraum von einigen Wochen trotz weiterer Äthioninzufuhr zu regenerieren.

Es scheint daher bemerkenswert, daß auch wir bei Tieren, die 35 Tage lang Äthionin erhalten hatten, wieder eine deutliche „Erholung" der Mikrosomenfermente nachweisen konnten (siehe Abb. 3). Auch das in den ersten Tagen nach der Äthioninbehandlung stark abgesunkene Körpergewicht steigt trotz weiterer Äthioninzufuhr langsam wieder an (Abb. 4). Es ist schwer zu entscheiden, ob dieser Rückgang der morphologischen Veränderungen und die Erholung der Fermentaktivität auf einer Gewöhnung des Organismus an den Antimetaboliten beruht. Ein ähnliches Verhalten ist bei fast allen sogenannten „Antimetaboliten" bekannt, wobei man eine Umstellung des Stoffwechsels oder einen vermehrten Abbau des Giftes — etwa durch adaptative Enzymsynthese — dafür verantwortlich machen muß.

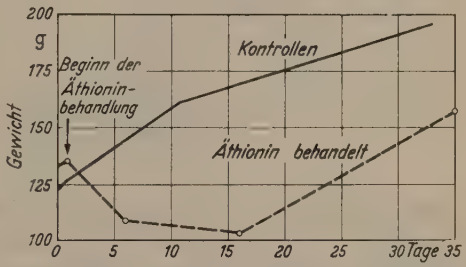


Abb. 4. Verhalten des Körpergewichts bei chronischer Äthioningabe (Mittelwerte von je 7 Tieren)

Die Wirkung des Äthionins kann durch Änderung der Substitution am Schwefelatom verloren gehen. Ersatz der Äthylgruppe durch eine Propyl- oder Allyl-Gruppe bewirkt, daß diese Stoffe keine morphologisch erfaßbaren Wirkungen mehr hervorrufen können (Stevens et al. 1955). In unseren Versuchen zeigte sich, daß das um ein C-Atom kürzere homologe S-Äthyl-Cystein weder makroskopisch zu einer Leberverfettung noch zu einer Schädigung der Mikrosomenfermente führt.

Zur weiteren Klärung der Spezifität der Fermenthemmung in den Mikrosomen bei Leberschädigung untersuchten wir andere Stoffe, deren leberschädigende Wirkung seit langem bekannt ist. Mit Tetrachlorkohlenstoff und gelbem Phosphor wurde in einer Dosierung, die zu einer schon makroskopisch deutlich erkennbaren Leberverfettung führte, auch eine deutlich nachweisbare Verminderung der Mikrosomenfermentaktivität erreicht (Abb. 5).

Diese Befunde erklären die von Butler u. Mitarb. (1952) sowie von Swinyard et al. (1952) gemachte Beobachtung, daß eine Reihe von Pharmaka bei Schädigung der Leber durch Tetrachlorkohlenstoff oder nach partieller Hepatektomie eine wesentlich verlängerte Wirkung zeigen.

Eine andere Art der Leberschädigung, bei der keine Verfettung gefunden wird, ist nach Einwirkung von Allylalkohol zu beobachten. Nach Eppinger (1935) kommt es nach Allylformiat zu einer „serösen" Entzündung, während Fleckenstein (1944) auch eine Wirkung auf die Parenchymzellen nachweisen konnte. Eger (1954) beobachtete nach Gaben von Allylalkohol, die unserer Dosierung

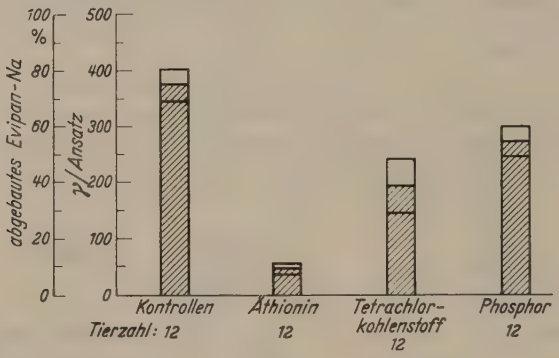


Abb. 5
Aktivität der Mikrosomenfermente nach Gabe verschiedener Lebergifte gemessen am Evipan-Abbau

entsprachen, das Auftreten von herdförmigen Nekrosen. Tab. 3 zeigt, daß diese Art der Leberschädigung zu einer relativ geringgradigen Abnahme der Aktivität der Mikrosomenfermente führt.

Es ist auffällig, daß die Aktivität der von uns untersuchten Mikrosomenfermente dann besonders vermindert ist, wenn gleichzeitig auch eine Leberverfettung beobachtet werden konnte. Das auslösende Agens selbst ist sicher nicht ohne Bedeutung, da eine vollständige Parallelität zwischen diesen Befunden nicht besteht. So weisen z. B. bei der Tetrachlorkohlenstoff-Vergiftung die Organe mit der stärksten Verfettung nicht immer die geringste Aktivität der Mikrosomenfermente auf und umgekehrt.

Tabelle 3. *Pyramidon-Abbau nach Allyl-Alkoholvergiftung*
Die Zahlen geben den Abbau in Prozent der vorgelegten Pyramidonmenge (500 γ) an. Methodik siehe Text

Exper. Nr.	Kontrollen	Allyl-Alkohol
1	34,0	18,1
2	27,6	32,0
3	28,3	22,2
4	27,8	22,2
5	40,5	19,1
6	35,7	25,4
7		16,9
Mittelwert:	32,3%	22,3%

$t = 3{,}7$; $P = 0{,}004$

Da die chemische Natur der Mikrosomenfermente, ihr Bedürfnis an Co-Fermenten und ihre Spezifität noch nicht bekannt sind, läßt sich über den genauen Wirkungsmechanismus der Schädigung durch die verschieden untersuchten Gifte nichts Näheres aussagen. Ganz allgemein scheint eine Schädigung des Leberparenchyms mit einem Versagen des von uns

untersuchten Fermentsystems in den Lebermikrosomen verbunden zu sein. Vielleicht liegt hier eine Erklärung für die von manchen Klinikern mitgeteilte Beobachtung, daß die Wirkung verschiedener Pharmaka, z. B. von Barbituraten, bei leberkranken Patienten verlängert ist.

Summary

The activity of enzyme-systems located in liver microsomes which take part in the metabolism of several drugs has been tested during injury of liver experimentally caused.

In ethionine-poisoned rats the sleeping time after Hexobarbital administration is markedly increased. This effect is due to the decreased enzymeactivity in the microsomes of liver cells. The action is of no specific significance because quite different kinds of liver injury f.i. caused by carbon tetrachloride or yellow phosphorus lead as well to an impairment of enzyme function.

Little effect occurs after application of allyl-alcohol.

The enzyme-system investigated is thought to be of no importance according to conversion or detoxification of ethionine.

Wir danken den Firmen E. Merck und Riedel-de Haën für die Überlassung des d,l-Äthionins und der Firma Nordmark für das S-Äthyl-Cystein.

Literatur

Axelrod, J., J. Reichenthal and B. B. Brodie: J. Pharmacol. a. Exper. Ther. **112**, 49 (1954). — Axelrod, J.: ibid. **117**, 322 (1956).

Becker, V.: Verh. Dtsch. Ges. Pathologie (40. Tagung) S. 247 (1956). — Dtsch. med. Wschr. **1957**, 221.

Brodie, B. B., J. J. Burns, L. C. Mark, P. A. Lief, E. Bernstein and E. M. Papper: J. Pharmacol. a. Exper. Ther. **109**, 26 (1953).

Butler, T. C., D. Mahaffee and C. Mahaffee: J. Pharmacol. a. Exper. Ther. **106**, 364 (1952).

Cook, L., J. J. Toner and E. J. Fellows: J. Pharmacol. a. Exper. Ther. **111**, 131 (1954).

Cooper, J. R., and B. B. Brodie: J. Pharmacol. a. Exper. Ther. **114**, 409 (1955).

Doerr, W.: Verh. Dtsch. Ges. Path. (37. Tagung) S. 292 (1953).

Dyer, H. M.: J. of Biol. Chem. **124**, 519 (1938).

Eger, W.: Virchows Arch. **325**, 648 (1954).

Eppinger, H.: „Die seröse Entzündung", Wien 1935.

Farber, E., D. Koch-Weeser and H. Popper: Endocrinology (Springfield, Ill.) **48**, 205 (1951).

Farber, E., and A. Segaloff: J. of Biol. Chem. **216**, 471 (1955).

Fleckenstein, A.: Arch. exper. Path. u. Pharmakol. **203**, 151 (1944).

Goldschmidt, S., u. R. Wehr: Z. physiol. Chemie **308**, 9 (1957).

Gross, D., and H. Tarver: J. of Biol. Chem. **217**, 169 (1955).

Herken, H., W. Hoffmann u. D. Maibauer: Naturwissenschaften **43**, 302 (1956).

Holck, H. G. O., M. A. Kanân, L. M. Mills and E. L. Smith: J. Pharmacol. a. Exper. Ther. **60**, 323 (1937).

Levine, M., and H. Tarver: J. of Biol. Chem. **192**, 835 (1951).

Lewy, H. M., G. Montañez and M. S. Dunn: J. of Biol. Chem. **212**, 985 (1955).

Lewy, H. M., E. A. Murphy and M. S. Dunn: Cancer Res. **15**, 302 (1955).
Neubert, D., u. H. Herken: Arch. exper. Path. u. Pharmakol. **225**, 453 (1955).
Nicholas, J. S., and D. H. Barron: J. Pharmacol. a. Exper. Ther. **46**, 125 (1932).
Remmer, H.: a) Arch. exper. Path. u. Pharmakol. (im Druck). — b) Verh. Dtsch. Ges. Pharmakol. Freiburg 1957.
Schlenk, F., and J. A. Tillotson: J. of Biol. Chem. **206**, 687 (1954).
Schlicht, I.: Virchows Arch. **326**, 568 (1955).
Scott, E. B.: A.M.A. Arch. Path. **58**, 129 (1954). — Proc. Soc. Exper. Biol. a. Med. **29**, 134 (1956).
Sidransky, H., and E. Farber: Federat. Proc. **16**, 372 (1957).
Singal, S. A., S. J. Hazan, V. P. Sydenstricker and J. M. Littlejohn: J. of Biol. Chem. **200**, 867 (1953).
Statkewitsch, P.: Arch. exper. Path. u. Pharmakol. **33**, 415 (1894).
Stekol, J. A., and K. Weiss: J. of Biol. Chem. **185**, 577 (1950).
Stevens, C. M., C. A. Johnson and R. Watanabe: J. of Biol. Chem. **212**, 49 (1955).
Swinyard, E. A., C. W. Lawrence and L. S. Goodman: J. Pharmacol. a. Exper. Ther. **104**, 309 (1952).
Wu, C.: Arch. of Biochem. a. Biophysics **55**, 230 (1955).
Wu, C., and J. L. Bollmann: J. of Biol. Chem. **210**, 673 (1954).

Prof. Dr. H. Herken, Pharmakologisches Institut der Freien Universität, Berlin-Dahlem, Thielallee 69/73

Arch. exper. Path. u. Pharmakol., Bd. 233, S. 151—162 (1958)

Aus dem Pharmakologischen Institut der Freien Universität Berlin

Wirkungsverlust des Diäthyl-p-Nitrophenylphosphats und Oktamethylpyrophosphoramids nach Vorbehandlung mit α-Hexachlorcyclohexan

Von

DIETHER NEUBERT und JOCHEN SCHAEFER

Mit 7 Textabbildungen

(Eingegangen am 21. Oktober 1957)

Die einmalige Vorbehandlung von Versuchstieren mit Hexachlorcyclohexanen (HCH) ruft allobiotische Wirkungen im Stoffwechsel des Zentralnervensystems hervor, die sich in einer langanhaltenden Krampfresistenz äußern (HERKEN 1950 a, b, c, d; HERKEN u. KLEMPAU 1950; COPER, HERKEN u. KLEMPAU 1951 a). Bei Ratten und anderen Tieren blieb eine sichere Krampfdosis von Cardiazol, Pikrotoxin und Scillirosid ohne Wirkung.

Später fanden COPER, HERKEN u. KLEMPAU (1951 b), daß sich die Krampfresistenz nicht nur auf die „klassischen" Krampfgifte und den Elektroschock bezieht. Auch Krämpfe und fibrillär-fasciculäre Zuckungen nach Applikation des Cholinesterasegiftes Diäthyl-p-Nitrophenylphosphat (Mintacol, Paraoxon, E 600) werden unterdrückt. Da Untersuchungen von HERKEN, MONNIER, COPER u. LAUE (1952) sowie von HERKEN, KEWITZ u. KLEMPAU (1952) einen zentralen Angriffspunkt der HCH in supratentorial gelegenen Abschnitten des Gehirns ergeben hatten, wurde zunächst an eine zentrale Beeinflussung der Erregung gedacht, die durch das Alkylphospat ausgelöst wird. Nachdem HERKEN u. NEUBERT (1953) zeigen konnten, daß bei den krampfresistenten Tieren der Anstieg des Acetylcholingehaltes im Gehirn nach Mintacol-Gabe wesentlich verringert ist, lag auch der Gedanke nahe, daß der cerebrale Acetylcholinstoffwechsel für das Zustandekommen motorischer Regulationen von Bedeutung sei.

Wir haben nun geprüft, ob die HCH-Vorbehandlung die Cholinesteraseaktivität verschiedener Organe verändert, um so einen Einblick in den Mechanismus der Schutzwirkung gegenüber der Mintacolvergiftung zu erhalten.

Methodik

Die Bestimmung der Cholinesteraseaktivität erfolgt mit der manometrischen Methode nach AMMON. Als Substrat diente Acetylcholin-Chlorid bzw. -bromid, das bei der Testung der Acetylcholinesterase in einer Endkonzentration von $4 \cdot 10^{-3}$ mol, bei der Serumcholinesterase von $1 \cdot 10^{-2}$ mol zugegeben wurde. Die Messungen erfolgten bei 35° C. Ein Versuchsansatz von 3,2 ml wurde mit 30—90 mg Gewebe (Frischgewicht) oder 0,1 ml Plasma beschickt. Die Versuchstiere waren männliche

weiße Mäuse im Gewicht von 17—25 g. Die Tiere wurden durch Dekapitation getötet, die Organe nach dem Ausbluten schnell herauspräpariert und in einem gekühlten Potter-Elvehjem-Homogenisator zerkleinert. In der Regel wurden die Organe von je 4 Tieren zusammen homogenisiert und die Esteraseaktivität als Mittelwert von 4 Tieren bestimmt.

Zur Hexachlorcyclohexan-Vorbehandlung wurde das in dieser Versuchsanordnung am sichersten wirksame α-Isomere benutzt, dem zur Toxicitätsverminderung eine Gabe des β-Isomeren vorausgeschickt wurde. Die Mäuse erhielten 9 Tage vor dem Versuch 250 mg/kg β-HCH und 4 Tage später 320—350 mg/kg α-HCH in öliger Lösung intraperitoneal injiziert. Es ist hierbei wichtig, die zu applizierende Ölmenge möglichst gering zu halten, da es sonst zu Resorptionsschwierigkeiten und Darmverklebungen kommen kann. Am 5. Tage nach der α-HCH-Gabe wurde dann das Mintacol in einer 1,5 mg-% Lösung subcutan injiziert und die Mäuse 30 min bzw. 24, 48 oder 72 Std später getötet. Das in einigen Versuchserien benutzte OMPA wurde in einer 0,07%igen wäßrigen Lösung ebenfalls subcutan appliziert. 14 mg/kg dieses Stoffes entsprachen etwa der LD_{30}, 12 mg/kg der LD_{10}.

Ergebnisse

Zunächst war die Frage zu klären, ob die alleinige Vorbehandlung mit HCH bereits einen Einfluß auf die Esteraseaktivität ausübt. Daher wurde die Gehirn- und Muskelesteraseaktivität von Tieren, die wie

Tabelle 1. *Einfluß der Hexachlorcyclohexan-Vorbehandlung auf die Aktivität der Acetylcholinesterase*

Esterase	Normal	250 mg β-HCH	
		+ 320 mg/kg α HCH	+ 400 mg/kg α HCH
Gehirn	672 ∓ 24 (40)	649 ∓ 20 (16)	678 ∓ 35 (12)
Skelet-Muskel .	119 ∓ 7 (24)	115 ∓ 11 (24)	120 ∓ 7 (12)

Die Zahlen geben die Esteraseaktivitäten in μMol gespalt. ACh/g × Std an. In den Klammern die Anzahl der Versuchstiere.

Tabelle 2. *Toxicität bei vorbehandelten Tieren und Kontrollen in Abhängigkeit von der applizierten Mintacoldosis*

Mintacol mg/kg	nicht vorbehandelt		mit HCH vorbehandelt	
	Zahl d. Tiere	gestorben	Zahl d. Tiere	gestorben
0,4	12	0	12	0
0,6	80	36	64	0
0,8	50	42	14	0

üblich mit 250 mg/kg β-HCH und 320 bzw. 350 mg/kg α-HCH vorbehandelt waren, mit der von Kontrolltieren, die nur entsprechende Mengen Rapsöl erhalten hatten, verglichen. Signifikante Unterschiede ergaben sich nicht (Tab. 1).

Wir haben dann HCH-vorbehandelte Tiere mit 0,6 mg/kg Mintacol — das entspricht etwa der LD_{40} — vergiftet und die Esteraseaktivität 30 min nach der Injektion im Gehirn und Serum geprüft. Abb. 1 zeigt, daß die

Hemmung der Esterase im Gehirn deutlich geringer ist als bei nicht vorbehandelten Tieren. Diese Veränderungen sind bei der Serumcholinesterase nicht zu erkennen. Hier ist die Aktivität bei vorbehandelten und nicht vorbehandelten Tieren gleich.

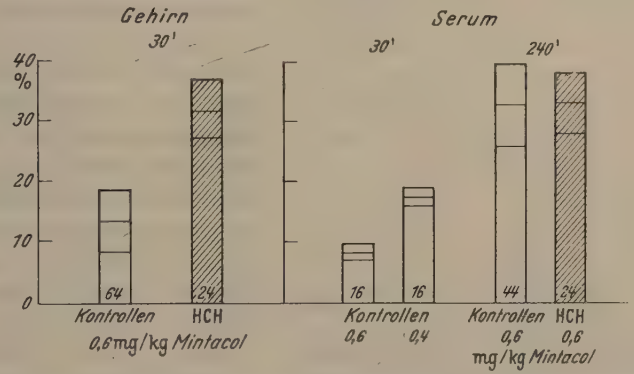


Abb. 1. Einfluß der Hexachlorcyclohexan-Vorbehandlung auf die Cholinesterasehemmung durch Mintacol in vivo. Esteraseaktivität in Prozent der Ausgangsaktivität. Die Zahlen in den Säulen geben Anzahl der Versuchstiere an. Bestimmung der Cholinesteraseaktivität zum jeweils angegebenen Zeitpunkt

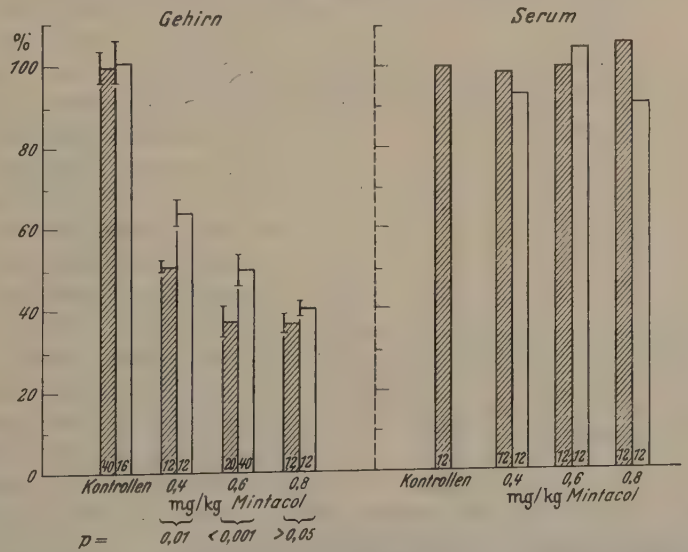


Abb. 2. Einfluß der Hexachlorcyclohexan-Vorbehandlung auf die Cholinesterasehemmung verschiedener Mintacoldosen in vivo. ▨ = nicht vorbehandelt; □ = mit HCH vorbehandelt; Mittelwerte ± σ. Die Zahlen in den Säulen geben die Anzahl der Versuchstiere an. Die Bestimmung erfolgte 24 Std nach der Mintacol-Gabe. Esteraseaktivität in Prozent der Ausgangsaktivität

Bei der Injektion verschieden hoher Mintacoldosen ergibt sich eine Dosisabhängigkeit des Schutzeffektes. Die Wirkung ist gegenüber niedrigen Dosen deutlicher ausgeprägt als gegenüber höheren (Abb. 2). Die

Untersuchungen wurden aus später zu diskutierenden Gründen an Mäusen durchgeführt, die die Mintacolgabe 24 Std überlebt hatten. Es fällt bei der Betrachtung der Abb. 2 auf, daß die Serumcholinesterase zu diesem Zeitpunkt bereits vollständig reaktiviert ist.

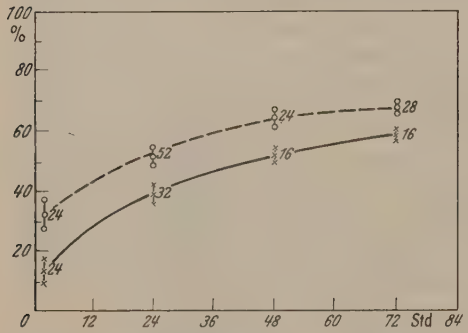


Abb. 3. Erholung der Gehirn-Acetylcholinesterase mit und ohne HCH-Vorbehandlung (0,6 mg/kg Mintacol). Werte in Prozent der Anfangsaktivität. —— = nicht vorbehandelt; ---- = mit HCH. Die Zahlen geben die Anzahl der Versuchstiere an. Mittelwerte ± σ

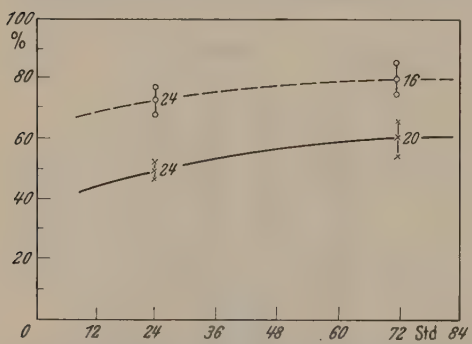


Abb. 4. Erholung der Skeletmuskel-Acetylcholinesterase mit und ohne HCH-Vorbehandlung (0,6 mg/kg Mintacol). Werte in Prozent der Anfangsaktivität. —— = nicht vorbehandelt; ---- = mit HCH. Die Zahlen geben die Anzahl der Versuchstiere an (gleiche Tiere wie in Abb. 3). Mittelwerte ± σ

Wir haben weiter untersucht, wie die allmähliche spontane Wiederherstellung der Esteraseaktivität nach der Mintacolinaktivierung in vivo bei den HCH-vorbehandelten Tieren verläuft. In einem Zeitraum bis zu 72 Std nach der Mintacol-Applikation war der Verlauf zu den Kontrollen annähernd parallel (Abb. 3). Die Aktivität der geschützten Tiere lag im Gehirn jeweils 10 bis 20% über den Kontrollwerten. Noch deutlicher wird der Unterschied, wenn bei den gleichen Tieren das Verhalten der Muskelesterase geprüft wird. Hier unterscheiden sich die Aktivitäten um gut 25% (Abb. 4). Die Zwerchfellesterase macht allerdings eine interessante Ausnahme: Bei vorbehandelten Tieren und Kontrollen werden völlig gleiche Werte gefunden (Abb. 5). Daß die Veränderung im Verhalten der Esteraseaktivität wie die Ausbildung der Krampfresistenz einige Zeit benötigt, geht aus Versuchen hervor, deren Ergebnisse in Abb. 6 dargestellt sind. Hierbei erkennt man auch, daß tatsächlich das α-Isomere für die Wirkung verantwortlich ist.

Zur Entscheidung der Frage, ob sich die Schutzwirkung des Hexachlorcyclohexans nur auf die Mintacolblockierung der Cholinesterase bezieht, oder ob auch bei anderen organischen Phosphorsäureestern ein Effekt zu erzielen ist, können die Versuche mit den Cholinesterasehemmstoffen DFP (Diisopropyl-Fluorophosphat) und OMPA (Oktamethyl-Pyrophosphoramid) herangezogen werden.

Bei der Vergiftung mit der LD_{50} von DFP war keine Verminderung der Toxicität und keine signifikante Veränderung an der Esterase — gemessen an der Gehirnesterase — zu erkennen (Tab. 3).

Im Gegensatz dazu ergab sich bei der Vergiftung mit OMPA ein dem Mintacol vollkommen gleichsinniges Verhalten. Auch hier wurde die Quadricepsesterase deutlich geschützt, während die Hemmung bei Kontrolltieren und HCH-behandelten Tieren beim Serum und Zwerchfell gleichstark ausfiel. Der Unterschied bei der Gehirnesterase ist deshalb schwer zu beurteilen, da dieses Ferment bekanntlich durch OMPA in vivo nur sehr wenig gehemmt wird (DuBois et. al. (1950), Frawley et al. (1952), Kewitz u. Nachmansohn 1957). Bei unseren Versuchen betrug der Prozentsatz

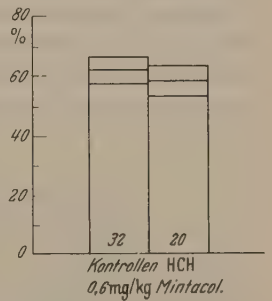


Abb. 5. Zwerchfell-Esterase. Gleiche Tiere wie in Abb. 3 und 4. Bestimmung 24 Std nach Mintacolgabe. Werte in Prozent der Anfangsaktivität. 100% = 160 µMol ACh/g × Std. Zahlen in den Säulen = Anzahl der Versuchstiere

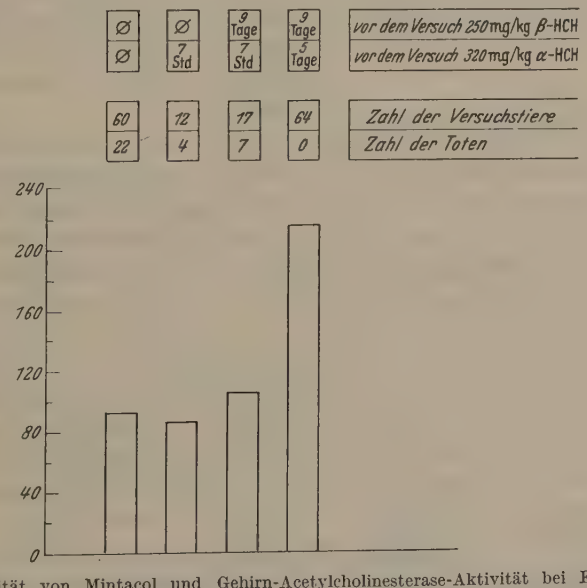


Abb. 6. Toxicität von Mintacol und Gehirn-Acetylcholinesterase-Aktivität bei Kontrollen und vorbehandelten Tieren in Abhängigkeit von der Zeitspanne zwischen HCH-Gabe und Versuch. Ordinate: µMol gespaltenes ACh/g Gewebe × Std

der Hemmung 13%. Offenbar dringt das wirksame Stoffwechselprodukt des OMPA nur schlecht in das Gehirn ein, da in vitro eine Hemmung der Esterase im Hirnhomogenat ohne weiteres möglich ist.

Die Untersuchungen wurden beim OMPA noch auf die Esterase des Herzmuskels ausgedehnt, dessen Cholinesteraseaktivität wie die des Zwerchfells reagierte (Abb. 7).

Ganz allgemein führten 12 mg/kg OMPA (etwa LD_{10}) in allen untersuchten Organen zu einer etwas stärkeren Hemmung der Cholinesterase, als es bei 0,6 mg/kg Mintacol (etwa LD_{40}) der Fall war. Außerdem fiel auf, daß die spontane Reaktivierung des Serums nach Hemmung mit diesem Cholinesterasegift bedeutend langsamer verlief als nach Mintacol. Ein ähnliches Verhalten haben DuBois et al. bei Ratten beschrieben.

Tabelle 3. *Einfluß der HCH-Vorbehandlung auf die Cholinesterasehemmung nach DFP (Gehirn)*

4 mg/kg DFP		Kontrollen
mit HCH	ohne HCH	
108	87	
104	97	672
101	85	
128	85	
94	125	
107	93	
16%	14%	der Ausgangsaktivität.

$t = 1{,}1$
$P = 0{,}3$

Werte in μMol gespalt. ACh/g Gewebe × Std. — 24 Std nach der DFP-Gabe gemessen

OMPA besitzt selbst nur eine geringe Hemmwirkung gegenüber der Cholinesterase und muß im Körper — bei Warmblütern besonders in der Leber — in die wirksame Form umgewandelt werden. Nach Schrader (1957) handelt es sich bei dem wirksamen Stoffwechselprodukt um ein Aminooxyd des OMPA.

Es mußte daher ausgeschlossen werden, daß vielleicht eine Leberschädigung, die einige Autoren — allerdings bei chronischer HCH-Applikation (Klimmer 1955) — beobachtet haben, bei dem Zustandekommen des Schutzeffektes die entscheidende Rolle spielt.

Tabelle 4. *Toxicität nach subcutaner Gabe von OMPA bei vorbehandelten Tieren und Kontrollen*

	OMPA	Zahl der Versuchstiere	Zahl der Tiere mit fibrillär-fasciculären Zuckungen	Zahl der Toten
Kontrollen	14 mg/kg	45	45	40
HCH-vorbehandelt	14 mg/kg	35	0	1
Kontrollen	12 mg/kg	45	10	5
HCH-vorbehandelt .	12 mg/kg	40	0	0

Da die Oxydation des OMPA wahrscheinlich von bestimmten Fermenten in den Lebermikrosomen durchgeführt wird (Davison 1955), haben wir orientierende Untersuchungen über die Aktivität dieser Fermentsysteme, die auch für die Umwandlung anderer Pharmaka wie z. B. Evipan verantwortlich sind, durchgeführt. Es konnte an anderer

Stelle gezeigt werden, daß es mit Hilfe von Schlafversuchen möglich ist, einen Einblick in die Aktivität dieser Enzyme zu erhalten. In dieser Richtung angestellte Versuche an Ratten und Mäusen haben keinen Anhalt dafür ergeben, daß diese Fermentsysteme bei einer einmaligen Gabe von β- und α-HCH geschädigt werden. Eine Verzögerung der Umwandlung von OMPA in das wirksame Produkt glauben wir damit ausschließen zu können.

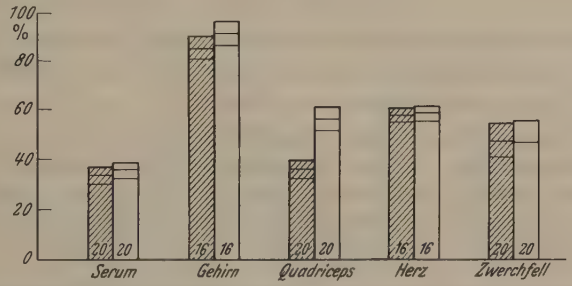


Abb. 7. Esteraseaktivität in verschiedenen Organen 24 Std nach Gabe von 12 mg/kg OMPA bei HCH-vorbehandelten Tieren und Kontrollen. ▨ ohne HCH; □ mit HCH. 100% Aktivität entspricht: Serum: 325 µMol ACh/ml Std; Gehirn: 672 µMol ACh/g · Std; M. Quadriceps: 119 µMol ACh/g · Std; Zwerchfell: 160 µMol ACh/g · Std. Werte in Prozent der Ausgangsaktivität. Die Zahlen geben die Anzahl der Versuchstiere an. Zur Bestimmung der Aktivität in den verschiedenen Organen wurden jeweils die gleichen Tiere verwendet

Diskussion

Die Esteraseaktivität der Kontrolltiere sowie der Prozentsatz der Aktivitätsverminderung nach nicht tödlichen Mintacoldosen befindet sich in guter Übereinstimmung mit den von anderen Autoren (Kewitz 1957; Kewitz u. Nachmansohn 1957; Kewitz, Wilson u. Nachmansohn 1956) gefundenen Werten. Der Unterschied in der Esteraseaktivität vorbehandelter Mäuse und von Kontrolltieren nach Gabe der Cholinesterasegifte ist in jedem der angeführten Fälle statistisch signifikant.

Gegen die Absolutwerte der Esteraseaktivitäten, die 30 min nach der Applikation von Mintacol gemessen wurden, könnten Bedenken vorgebracht werden: Kewitz u. Nachmansohn haben gezeigt, daß ein Teil des zugeführten Cholinesterasegiftes wegen seiner guten Lipoidlöslichkeit in extracellulären Lipoiden liegenbleiben kann, und auf diese Weise von der Reaktion mit der Esterase ausgeschlossen wird. Dieses Mintacol könnte dann beim Homogenisieren mit der noch ungehemmten Esterase reagieren, und so eine stärkere Hemmung vortäuschen, als vorher in vivo tatsächlich vorhanden war. Wir haben diese experimentelle Schwierigkeit dadurch vermieden, daß wir die Esteraseaktivität 24 Std nach der Mintacol-Gabe bestimmten. Nach Kewitz u. Nachmansohn ist zu diesem Zeitpunkt kein freies Mintacol mehr vorhanden, so daß die Auswertung nicht gestört werden kann. In unserer Versuchsanordnung kann der Aktivitätsunterschied jedoch auch bei den nach 30 min getöteten

Tieren als vorhanden angenommen werden, da durch freies Mintacol höchstens eine zusätzliche Hemmung auftreten könnte und der Unterschied dann in Wirklichkeit in vivo noch ausgeprägter sein müßte.

Die Schutzwirkung, die durch eine Hexachlorcyclohexan-Vorbehandlung erzielt wird, ist nicht sehr hochgradig. Sie beschränkt sich darauf, daß die einfache LD_{100} von 0,9 mg/kg Mintacol von allen vorbehandelten Tieren toleriert wird. Bei der doppelten LD_{100} sterben jedoch bereits alle Tiere. Der von uns beobachtete Schutzeffekt ist geringer als der jener hochwirksamen Verbindungen, die Kewitz u. Nachmansohn und später auch Bethe, Erdmann, Lendle u. Schmidt (1957) (z. B. PAM, Methylpyridin-2-aldoxim jodid) beschrieben haben.

Über die biochemischen Veränderungen, die durch die HCH in den Zellen ausgelöst werden können, ist noch sehr wenig bekannt. Helge konnte z. B. eine Entkoppelung von Atmung und Phosphorylierung bei Neurospora crassa durch das δ-Isomere nachweisen. Dieser Effekt wurde von ihm jedoch als unspezifische Wirkung gedeutet und ist für die Krampfresistenz des Warmblüters sicher nicht entscheidend.

Der Wirkungsmechanismus der beobachteten Schutzwirkung gegenüber Mintacol könnte erklärt werden:

1. durch einen schnelleren Abbau des Mintacols bei vorbehandelten Tieren,

2. durch eine verzögerte Resorption des Mintacols bei vorbehandelten Tieren,

3. durch eine erhöhte Esteraseaktivität bei vorbehandelten Tieren bereits vor der Mintacolgabe,

4. durch die Bildung einer unwirksamen Verbindung des Mintacols mit noch unbekannten Stoffen bei vorbehandelten Tieren,

5. durch eine Reaktivierung des gehemmten Fermentes.

Diese 5 Punkte sollen im folgenden diskutiert werden.

Im Verlaufe der Untersuchungen rechneten wir zunächst mit der Möglichkeit, daß die *Spaltung* des Mintacols, dessen Abbau durch bestimmte Phosphatasen im Serum bekannt ist (Augustinsson 1953), unter dem Einfluß des HCH beschleunigt wird, und so eine geringere Mintacolkonzentration in den Geweben entstehen und zur Wirkung kommen würde. Eine ähnliche Ansicht hatten Ball, Sinclair, Crevier u. Kay (1954) vertreten, die unter dem chlorierten Kohlenwasserstoff Aldrin und auch beim γ-HCH eine Zunahme der „Aliesterase"-Aktivität beobachteten, die nach Aldridge für die Hydrolyse des Mintacols verantwortlich sein soll. Eine derartige Erklärung kommt für unsere Versuche nicht in Frage. Abgesehen davon, daß mit dem γ-Isomeren eine Toxicitätsverminderung des Mintacols nicht beobachtet wurde (Coper, Herken, Klempau 1951 b), müßte man bei einer Konzentrationsverminderung des Cholinesterasegiftes mit einer geringeren Esterasehemmung in *allen* Organen rechnen. Dies ist jedoch, wie Abb. 1 zeigt, z. B. bei der Serumesterase nicht der Fall. Da das Mintacol aber besonders im Serum zerstört wird (Augustinsson), wäre gerade hier ein besonders

deutlicher Effekt zu erwarten, wenn die oben angeführte Hypothese zuträfe. Die zu erwartende *Verminderung* der zur Wirkung kommenden Mintacolkonzentration müßte bei unserer Versuchsanordnung gut nachweisbar sein. Dies zeigen Versuche, bei denen in dem in Frage kommenden Bereiche mit verschiedenen Mintacoldosen deutlich verschiedene Hemmungen der Esterase erhalten wurden (Abb. 1).

Aus den gleichen Gründen scheidet auch eine verzögerte *Resorption* des Mintacols als Ursache der Schutzwirkung aus.

Ball, Sinclair, Crevier u. Bay haben eine Aktivitätssteigerung einer Serumesterase bei der Behandlung von Ratten mit chlorierten Kohlenwasserstoffen gefunden. Da eine *Aktivitätssteigerung* bestimmter Fermente also prinzipiell durch Applikation von chlorierten Insektiziden möglich ist, interessierte uns die Frage, ob sich ein ähnlicher Anstieg nach Vorbehandlung mit β- und α-HCH auch in der Aktivität der Acetylcholinesterase nachweisen läßt. Wie aus Tab. 1 ersichtlich ist, verändert sich die Aktivität der Gehirn- und Muskelesterase jedoch unter der Behandlung mit HCH nicht.

Damit kann zur Erklärung des von uns gezeigten Effektes des HCH nur eine *Inaktivierung* des Mintacols in bestimmten Organen, oder aber eine *Reaktivierung* der gehemmten Esterase angenommen werden. Die Tatsache, daß gegenüber DFP keine deutliche Schutzwirkung auftritt, könnte für eine Reaktivierung des durch Mintacol blockierten Fermentes sprechen. Es ist nämlich bekannt, daß ein durch DFP inaktiviertes Enzym wesentlich schlechter zu reaktivieren ist als eine durch Äthylester gehemmte Cholinesterase. Das läßt sich auch beim PAM deutlich zeigen. Auch die Beobachtung, daß eine HCH-Vorbehandlung die Vergiftungssymptome bei Eserin-Gaben nicht aufzuheben vermag (Herken, Kewitz u. Klempau 1952, Herken u. Neubert 1953), würde gut zu dieser Vorstellung passen. Das Eserin greift offenbar an einer anderen Stelle des Fermentmoleküls an als die organischen Phosphorsäureester (Wilson 1954). Da es zu keiner festen Bindung mit dem Eiweiß kommt, ist auch keine „Reaktivierung" möglich.

Sehr interessant ist, daß mit α-HCH eine deutliche Wiederherstellung der Esteraseaktivität nach OMPA erreicht werden kann, was mit PAM *nicht* gelungen ist. Die Schutzwirkung erstreckt sich über einen Dosisbereich, der dem bei Mintacol völlig entspricht. Bei der einfachen LD_{100} werden alle Tiere geschützt, bei der doppelten keines.

Die Schutzwirkung der Hexachlorcyclohexane wurde bisher fast nur gegenüber zentral erregenden Pharmaka untersucht. Es ist daher verständlich, daß zunächst der Effekt im Zentralnervensystem besonders beachtet wurde. Aus unseren Versuchsergebnissen kann geschlossen werden, daß die Wirkung der HCH umfassender ist, als bisher angenommen und sich auch außerhalb des Zentralnervensystems nachweisen

läßt. Für die Beeinflussung der zentral erregenden Pharmaka dürfte die periphere HCH-Wirkung keine Bedeutung besitzen. Nach Decerebrierung ist hier keine Krampfresistenz mehr nachweisbar. Zur Erklärung der Wirkungsabschwächung der Cholinesterasegifte muß aber sicher auch ein peripherer Angriffspunkt der HCH angenommen werden. Dies wird besonders deutlich, wenn man die Schutzwirkung gegenüber OMPA betrachtet. Da hier die Gehirncholinesterase kaum gehemmt ist, dürfte für die Aufhebung der letalen Wirkung vor allem die Reaktivierung in der Peripherie von Bedeutung sein. Mit diesem Hemmstoff läßt sich daher ein peripherer Angriffspunkt der HCH besonders gut demonstrieren.

Die Wirkung der HCH ist als typisch allobiotisch im Sinne der von Heubner (1937) gegebenen Definition aufzufassen. Das heißt, die Wirkung tritt mehrere Tage nach der Applikation des Schutzstoffes auf, zu einem Zeitpunkt, an dem die Konzentration am Wirkungsorte mit großer Wahrscheinlichkeit schon wieder abgesunken ist. Für den allobiotischen Charakter dieses Effektes spricht auch der Befund, daß verzettelte, über längere Zeit gegebene kleine Dosen des HCH keinen Schutz ergeben, obgleich in diesem Falle mit einer Kumulation zu rechnen ist. Aus Abb. 6 geht hervor, daß auch bei unserer Versuchsanordnung eine Abschwächung der Vergiftung mit Alkylphosphaten erst nach einer Latenzzeit von mehreren Tagen zu beobachten ist. Eine einmalige größere Dosis der HCH führt offenbar zu einer nachhaltigen Stoffwechselstörung, bei der Substanzen gebildet werden, die das Ferment reaktivieren und den Körper in die Lage versetzen, die tödliche Dosis des Alkylphosphates zu tolerieren. Es müssen also offenbar *körpereigene* Stoffe den Schutz entfalten. Die verschiedene Reaktivierungsfähigkeit der einzelnen Organe könnte auf einem verschiedenen Gehalt an derartigen Reaktivatoren beruhen. Es ist in diesem Zusammenhange bemerkenswert, daß die Geschwindigkeit der Reaktivierung in den Organen, die normalerweise schon eine schnelle Wiederherstellung der Aktivität nach der Mintacolvergiftung zeigen, durch eine HCH-Vorbehandlung nicht beeinflußt wird. Dies ist z. B. bei der Serumcholinesterase der Fall, deren Aktivität bereits 24 Std nach einer Mintacolvergiftung völlig normale Werte erreicht hat und bei der Zwerchfellesterase, deren Reaktivierung spontan wesentlich schneller vor sich geht, als dies bei der Esterase der übrigen Skeletmuskulatur (m. gastrocnemius oder m. quadriceps) geschieht.

Die Tatsache, daß sich das Zwerchfell auch biochemisch anders verhält als die übrige Skeletmuskulatur, erscheint verständlich. Dieser Muskel nimmt ja auch bei der Vergiftung mit anderen Stoffen, wie z. B. Curare, eine gewisse Sonderstellung ein. Die Frage, ob sich die Art der Acetylcholinesterase von der übrigen Muskulatur unterscheidet, ist mit unserer Versuchsanordnung nicht zu entscheiden.

Der Gedanke, daß körpereigene Stoffe zu einer Reaktivierung führen können, ist nicht ganz neu. So hat Wilson (1952) eine größere Reihe von Substanzen wie z.B. Cholin und Kreatin in vitro auf diese Fähigkeit hin untersucht. Dabei zeigte sich, daß tatsächlich einige Verbindungen eine, wenn auch recht geringe, Reaktivierung bewirken können.

Eine Anhäufung von körpereigenen Verbindungen nach HCH-Gabe ist prinzipiell möglich. So konnten Coper, Herken u. Koransky nach Applikation von β- oder γ-HCH eine Vermehrung bestimmter Nucleotidderivate im Rattengehirn nachweisen, die auf einer Schädigung oder Hemmung noch nicht näher bekannter Enzymsysteme beruhen kann. Es ist nicht ausgeschlossen, daß die Kumulation dieser Nucleotide oder anderer Verbindungen an der Reaktivierung der vergifteten Cholinesterase beteiligt ist.

Summary

Pretreatment with α-hexachlorcyclohexane in mice yields a protection against inhibitors of acetylcholinesterase as Paraoxon and OMPA after a latency of some days.

Besides a lowering in toxicity there is a much smaller inhibition of cholinesterase in brain and skeletal muscle in pretreated animals compared to the controls, which received the anticholinesteratic drug only.

Under the same experimental conditions no differences between the activities in serum, diaphragm and heart muscle could be observed.

This protective effect is probably due to a reactivation of the inhibited enzyme by physiological metabolites, which cumulate during HCH treatment.

Similiar distinct effects against the poisoning with DFP could not be found.

These results lead to the conclusion, that HCH has not only an effect on the central nervous system but also on peripheral organs, like muscle.

Therefore the protective effect of HCH against anticholinesterases will mainly depend on the reactivation of the inhibited enzyme in the periphery, while that against convulsant drugs takes place in some parts of the central nervous system.

Herrn Prof. Dr. W. Wirth danken wir für die freundliche Überlassung von Mintacol — und OMPA — Reinsubstanz.

Literatur

Aldridge, W. N.: Biochemic. J. **53**, 117 (1953).

Augustinsson, K.-B.: Acta pharmac. tox. K'hvn **9**, 245 (1953).

Ball, W. L., J. W. Sinclair, M. Crevier, and K. Kay: Canad. J. Biochem. Physiol. **32**, 440 (1954).

Bethe, K., W. D. Erdmann, L. Lendle u. G. Schmidt: Arch. exper. Path. u. Pharmakol. **231**, 3 (1957).

Coper, H., H. Herken u. I. Klempau. — a) Arch. exper. Path. u. Pharmakol. **212**, 463 (1951). — b) Naturwissenschaften **38**, 69 (1951).
Coper, H., H. Herken u. W. Koransky: noch unveröffentlichte Versuche.
Davison, A. N.: Biochemic. J. **61**, 203 (1955).
DuBois, K. P., J. Doull and J. M. Coon: J. Pharmacol. a. Exper. Ther. **99**, 376 (1950).
Frawley, J. P., E. C. Hagan and O. G. Fitzhugh: J. Pharmacol. a. Exper. Ther. **105**, 156 (1952).
Helge, H.: bisher unveröffentlichte Untersuchungen.
Herken, H: a) Arch. exper. Path. u. Pharmakol. **212**, 158 (1950). — b) Ärztl. Wschr. **1950**, 193. — c) Klin. Wschr. **1950**, 582. — d) Arch. exper. Path. u. Pharmakol. **211**, 143 (1950).
Herken, H., u. I. Klempau: Naturwissenschaften **37**, 493 (1951).
Herken, H., M. Monnier, H. Coper u. H. Laue: Experientia (Basel) 8, 432 (1952).
Herken, H., H. Kewitz. u. I. Klempau: Arch. exper. Path. u. Pharmakol. **215**, 217 (1952).
Herken, H., u. D. Neubert: Arch. exper. Path. u. Pharmakol. **219**, 223 (1953).
Heubner, W.: Kongr. Therapeut. Union, Bern 1937.
Kewitz, H.: Arch. of Biochem. a. Biophysics **66**, 263 (1957).
Kewitz, H., and D. Nachmansohn: Arch. of Biochem. a. Biophysics **66**, 271 (1957).
Kewitz, H., I. B. Wilson and D. Nachmansohn: Arch. of Biochem. a. Biophysics **64**, 456 (1956).
Klimmer, O. R.: Arch. exper. Path. u. Pharmakol. **227**, 183 (1955).
Schrader, G.: Angew. Chemie **69**, 86 (1957).
Wilson, I. B.: J. of Biol. Chem. **199**, 113 (1952). — The Mechanism of Enzyme Action. Baltimore: John Hopkins Press 1954.

Dr. Diether Neubert, Pharmakolog. Institut d. Freien Universität Berlin-Dahlem, Thielallee 69/73

Arch. exper. Path. u. Pharmakol., Bd. 233, S. 163—172 (1958)

Aus dem Pharmakologischen Institut der Freien Universität Berlin

Untersuchungen über den Antagonismus zwischen Atropin und Cholinesterasegiften mit Hilfe einer mikrobiologischen Methodik

Von

DIETHER NEUBERT und DIETER MAIBAUER

Mit 2 Textabbildungen

(Eingegangen am 22. Oktober 1957)

Die gebräuchlichen Methoden zur Bestimmung der Cholinesteraseaktivität beruhen auf dem Nachweis der Essigsäure, die bei der enzymatischen Hydrolyse des Acetylcholins entsteht. Nach diesem Prinzip arbeitet sowohl die manometrische Methode nach AMMON (1934) als auch neuere elektrometrische Bestimmungen wie die von MEYER u. WILBRANDT (1954). Beide Verfahren sind einfach und schnell durchzuführen; sie müssen jedoch mit hohen Substrat- und Fermentkonzentrationen arbeiten. Dies kann bei manchen Untersuchungen einen Mangel darstellen.

Prinzipiell bestehen noch zwei weitere Möglichkeiten, die Hydrolyse des Acetylcholins quantitativ zu verfolgen und damit ein Maß für die Esteraseaktivität zu erhalten:

1. Die Bestimmung der Abnahme des Acetylcholins im Reaktionsgemisch und
2. Die Bestimmung des Cholins nach Hydrolyse des Esters.

Die Messung der Acetylcholinmenge bereitet methodisch keine Schwierigkeiten. Mit Hilfe von biologischen Bestimmungen an überlebenden Organen wie dem Blutegelpräparat (FÜHNER 1918) oder dem m. rectus abdominis des Frosches (CHANG u. GADDUM 1933) sowie der Blutdruckmessung am eviscerierten Tier können noch sehr kleine Mengen quantitativ erfaßt werden. Auch ein chemischer Nachweis des Acetylcholins ist möglich (HESTRIN 1949).

Der dritte Weg, nämlich die Bestimmung des bei der Acetylcholinspaltung freiwerdenden Cholins ist unseres Wissens noch nicht begangen worden. Dieser Umstand lag am Fehlen einer zuverlässigen und empfindlichen Nachweismethode für diese Verbindung. Auch die neueren chemischen Verfahren von MARQUARDT u. VOGG (1952) und APPLETON, LA DU et al. (1953) entsprechen diesen Anforderungen nicht.

Es ist jedoch möglich, mit Hilfe mikrobiologischer Verfahren auch kleine Cholimengen zu erfassen. Unter Verwendung einer cholinbedürftigen Mutante von Neurospora crassa konnten wir einige Erfahrungen sammeln. Es wurde versucht, damit eine Methode zur Bestimmung der Cholinesteraseaktivität zu entwickeln, die mit einer geringeren Substratkonzentration arbeitet als die bisher üblichen Verfahren.

An einer solchen Methode waren wir aus folgendem Grunde interessiert:

Wir beschäftigten uns mit dem Antagonismus zwischen Atropin und Cholinesterasegiften und hatten in früheren Untersuchungen in Anlehnung an die Versuche von Wirth (1949) gefunden, daß nach einer Vorbehandlung mit Atropin bei Mäusen die Vergiftungssymptome vieler Cholinesterasegifte gemildert oder sogar ganz unterdrückt werden konnten. Es sollte jetzt am Beispiel des Mintacols (Diäthyl-p-Nitrophenylphosphat) geprüft werden, ob sich auch ein Schutzeffekt an der Cholinesterase nachweisen läßt.

Methodik

Verwendet wurden männliche Albino-Mäuse im Gewicht von 15—25 g. Atropin sulf. wurde in einer hohen Dosis von 100—150 mg/kg $^1/_2$—1 Std vor der Applikation des Cholinesterasegiftes intraperitoneal injiziert. Die Tiere erhielten das Mintacol durch subcutane Injektion der wäßrigen Lösung. An Tieren des gleichen Stammes ermittelten wir vorher diejenige Dosis des Cholinesterase-Hemmstoffes, die bei allen Tieren einen Krampf auslöste. Sie betrug 0,9 mg/kg. Die Mäuse wurden auf der Höhe des Krampfanfalles dekapitiert; die vorbehandelten Tiere zu einem entsprechenden Zeitpunkte getötet. Das Blut fingen wir in Röhrchen von etwa 4 mm lichter Weite und 7 cm Länge auf. Die Gerinnung wurde durch Zugabe eines kleinen Kristalles von polyäthylensulfosaurem Natrium verhindert, nach Abzentrifugieren der Erythrocyten das Plasma abpipettiert und die roten Blutkörperchen dreimal mit 0,9%iger NaCl-Lösung gewaschen. Das Plasma wurde dann mit einer Lösung, welche die für eine optimale Funktion der Cholinesterase notwendigen Ionen enthielt (0,15 mol NaCl, 0,04 mol $MgCl \cdot 6\,H_2O$ + Phosphat-HCl-Puffer p_H 6,0 5 : 1; Augustinsson 1950), im Verhältnis 1 : 100 verdünnt, die Erythrocyten mit der gleichen Lösung im 50fachen Volumen der ursprünglichen Blutmenge suspendiert. In einigen Versuchen wurde nach dem Ausbluten des Tieres auch die Esteraseaktivität des Gehirns bestimmt. Hierzu wurde das Organ in 0,9% NaCl-Lösung im Homogenisator der Fa. E. Bühler bei 40000 U/min zerkleinert, das Homogenat 1 : 200 verdünnt und wie oben beschrieben getestet. Die Spaltung des Acetylcholins beendeten wir nach bestimmten Zeiten durch Zugabe von Eserin (1 : 3000) und bestimmten den Cholingehalt der Lösung mikrobiologisch.

Das Reaktionsgemisch setzte sich wie folgt zusammen:

Fermentlösung	1,0 ml
Acetylcholin-Lösung	2,0 ml (35 γ)
Eserinlösung	0,5 ml (1 : 3000)
Gesamtmenge	3,5 ml.

Die Reaktionstemperatur betrug bei allen Versuchen etwa 22° C.

Alle Werte sind auf Cholin- bzw. Acetylcholin-Chlorid (Merck bzw. La Roche) bezogen. Die genaue Einstellung dieser Lösungen erfolgte durch mercurimetrische Bestimmung des Chloridgehaltes nach der Methode von Lang (1937).

Um eine spontane Zersetzung des Acetylcholins hintanzuhalten, wurde das p_H des Reaktionsgemisches auf etwa 6,0 eingestellt und damit bewußt auf die Einhaltung des p_H-Optimums der Cholinesterasen (Alles u. Hawes 1940, Werle u. Uebelmann 1938) von 7,5—8,5 verzichtet.

Der mikrobiologischen Bestimmung des Cholins lag die Methode von Horowitz u. Beadle (1943) zugrunde. Verwendet wurde eine cholinbedürftige Mutante von Neurospora crassa (34486 ATCC 9277). Das Verfahren beruht darauf, daß bei

ausreichender Konzentration aller nötigen Stoffe das Ausmaß des Wachstums proportional der im Nährmedium vorhandenen Cholinmenge ist. Die Auswertung erfolgte durch Wägung des Trockenmycels.

Je 5 ml eines Mediums (GYÖRGY 1950, Nr. 48a) wurden im 100 ml Erlenmeyer-Kölbchen einpipettiert, je 1 ml der zu untersuchenden Lösung zugegeben und auf 10 ml mit 0,9%iger NaCl-Lösung aufgefüllt. Nach Sterilisation im Autoclaven (0,5 Atü) beimpften wir mit je einem Tropfen Sporensuspension. Die Sporen stammten von einer 3—5 Tage alten Kultur auf Schrägagar (Medium 48a + 1,5% Agar, 0,2% Hefeextrakt, 0,2% Malzextrakt + 1 γ/ml Cholin). Sie wurden in steriler 0,9%iger NaCl-Lösung aufgeschwemmt und von den anhaftenden Mycelteilchen durch ein steriles Wattefilter befreit.

Die Kulturen wurden bei 30° C mehrere Tage bebrütet, nach ausreichender Mycelbildung durch kurzes Erhitzen im Autoclaven abgetötet und die Mycelien gewaschen, getrocknet und gewogen.

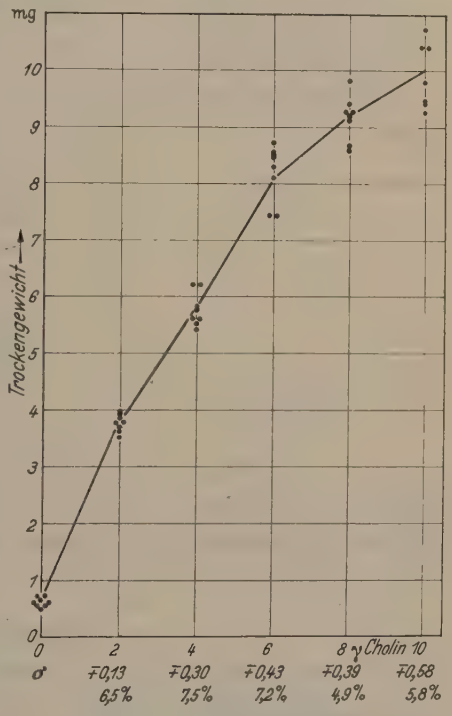


Abb. 1. Eichkurve zur Cholinbestimmung mit der Neurospora-Mutante

Jede Bestimmung erfolgte dreifach, in Ausnahmefällen mindestens doppelt unter Verwendung der Mittelwerte. Bei jeder Bestimmung wurden gleichzeitig Kulturen mit bekanntem Cholingehalt angesetzt und wie oben beschrieben behandelt. Die so erhaltenen Werte wurden zu einer Eichkurve zusammengestellt und die anderen hiermit verglichen. Eine typische Eichkurve zeigt die Abb. 1. Das p_H der Kulturen betrug etwa 5,5, um auch hier eine Spontanhydrolyse des noch vorhandenen Acetylcholins so niedrig wie möglich zu halten. Die wachstumsbeschleunigende Wirkung des Acetylcholins belief sich in Kontrollversuchen auf etwa 8% der äquimolaren Cholinmenge (Tab. 1, S. 166). Diese Werte liegen deutlich niedriger als die von HOROWITZ, BONNER und HOULAHAN (1945) unter ähnlichen Verhältnissen gefundenen. Dieser Effekt dürfte auf einer teilweisen Spaltung des Acetylcholins während der Wachstumsperiode (3 Tage und mehr) beruhen.

Die Genauigkeit der mikrobiologischen Bestimmung wurde geprüft, indem der nach der Spaltung verbleibende Acetylcholinrest mit der Frosch-rectus-Methode ermittelt wurde (Tab. 2, S. 167).

Da die Bestimmung der Gehirnesteraseaktivität mit der Neurospora-Methode wegen des hohen und schwankenden Cholingehaltes nicht immer möglich war, und das Ergebnis wegen der zu geringen Zahl der verwertbaren Versuche statistisch nicht ganz eindeutig belegt werden

Tabelle 1

Bestimmung der Spontanhydrolyse von Acetylcholin während der Inkubation mit der Neurospora-crassa-Mutante (Bebrütungszeit 8 Tage)

Vorgelegte ACh γ	5	10	20	25	50	250
entspricht Cholin γ	3,6	7,2	14,4	18,0	35,9	179,5
gefundene Cholinmenge γ	0,1	0,5	1,0	1,2	2,5	10,0
	0,1	0,6	1,2	1,6	1,6	20,0
		0,4	1,4			
		0,5	1,4			
		0,7	1,7			
		0,6	1,35			
		0,8	1,5			
		0,8	1,75			
		0,7				
		0,25				
		0,4				
		0,6				
$M =$	0,1	0,6	1,4	1,4	2,05	15,0
% =	2,8	8,3	9,7	7,8	5,7	8,3

konnte, kontrollierten wir den Einfluß des Atropins auf die Hemmung der Acetylcholinesterase im Mäusegehirn nach Mintacolgabe mit der manometrischen Methode nach Ammon (150 Tiere).

Ergebnisse

In Vorversuchen wurde festgestellt, daß Atropin (10 γ-%), Eserin (4,5 mg-%) und Mintacol (1 γ-%) keinen Einfluß auf das Wachstum der Mutante ausübten.

Bei den an insgesamt 40 Mäusen durchgeführten Untersuchungen über den Antagonismus zwischen Atropin und dem Cholinesterasegift mit der mikrobiologischen Methode wurden in der Regel bei jedem Tier die Aktivität der Serum-, Erythrocyten- und Gehirnesterase bestimmt. In jedem Falle konnte die Hemmung der Acetylcholinesterase und der Serumcholinesterase durch vorhergehende intraperitoneale Gabe von Atropin deutlich abgeschwächt werden (Abb. 2, S. 168).

24 Std nach der Mintacolgabe war an der Gehirnesterase ein Unterschied zwischen den mit Atropin vorbehandelten Tieren und den Kontrollen, die nur das Cholinesterasegift erhalten hatten, nicht mehr festzustellen (Tab. 3, S. 169).

Alle sonstigen Vergiftungserscheinungen wie fibrilläre und fasciculäre Zuckungen und Krämpfe, die nach Injektion des Cholinesterasegiftes in der verwandten Dosis regelmäßig auftraten, wurden bei den atropinbehandelten Mäusen vermißt oder traten nur sehr abgeschwächt auf.

Tabelle 2. *Kontrolle der mikrobiologischen Methode durch Nachweis des im Reaktionsgemisch verbliebenen Acetylcholins am Froschrectus*

	noch vorhandenes ACh γ/ml (Rectus)		freigesetztes Cholin γ/ml (Mutante)		die freigesetzte Cholinmenge ist äquivalent ACh γ/ml	Summe von 1 + 3 bezogen auf ACh (erwartet 10 γ)	Fehler	
							Differenz vom theoret. Wert	%
1			2		3	4		
I.	6,5		2,5					
	7,7	7,3	3,1					
	7,7		2,8	2,8	3,6	10,9	0,9	+ 9
			2,6					
			3,0					
II.	6,1		3,1					
	7,3	6,8	3,5					
	7,0		3,7	3,3	4,3	11,1	1,1	+ 11
			3,3					
			3,4					
III.	6,0		3,4					
	7,5	6,8	3,8					
	6,9		4,0	3,6	4,7	11,5	1,5	+ 15
			3,5					
			3,4					
IV.	5,7		4,2					
	5,0	5,4	4,0					
	5,5		4,7	4,7	6,1	11,5	1,5	+ 15
			5,6					
			5,0					
V.	2,9		5,8					
	2,5	2,8	6,0					
	3,0		6,5	6,5	8,2	11,3	1,3	+ 13
			7,2					

10 γ/ml vorgelegt. Die Werte geben die Mengen an, die in verschiedenen Versuchen (I—V) nach Beendigung der Spaltung mit den beiden Methoden gefunden wurden. (Dreifach- bzw. Fünffach-Bestimmungen).

Diskussion

Mit der verwendeten Methode kann eine ausreichend genaue Aktivitätsbestimmung der Cholinesterasen durchgeführt werden. Die Fehlerbreite liegt bei Dreifachbestimmungen um 10% und stellt so einen für biologische Methoden tragbaren Wert dar.

In der benutzten Versuchsanordnung spricht die Mutante ausschließlich auf Cholin an. Methionin, das in höheren Konzentrationen (0,4 mg-%) ebenfalls das Wachstum der Mutante stimuliert, ist in dieser Menge nicht vorhanden

Die Methode hat den Vorteil, daß gleichzeitig unter völlig gleichen Bedingungen eine große Anzahl von Proben angesetzt werden kann. Wir

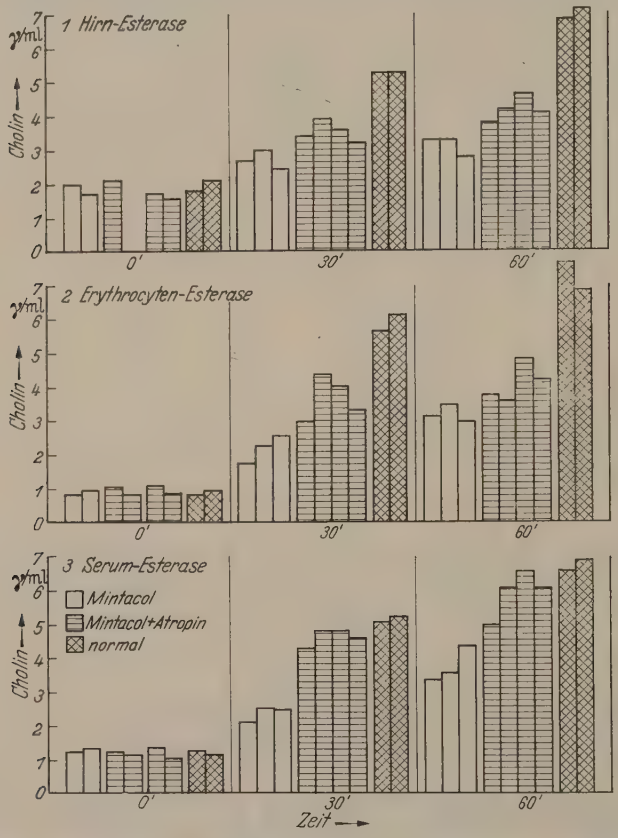


Abb. 2. Beispiel eines Versuches: Gleichzeitige Cholinbestimmung sämtlicher Ansätze einer Versuchsserie. Jede Säule stellt die Esteraseaktivität einer Maus dar. Die Pharmaka wurden den Tieren s.c. bzw. i.p. appliziert. Bestimmung der Serum-, Erythrocyten- und Gehirnesterase bei jedem Tier. Die Abszisse gibt den Zeitpunkt der Eserinzugabe zu dem Reaktionsgemisch an. Die freigesetzte Cholinmenge gilt als Maß der Esteraseaktivität. Vorgelegt: 10 γ Acetylcholin/ml

haben in einigen Versuchsserien über 150 Kulturen getestet. Der Vergleich der mikrobiologischen Analyse mit der Auswertung am Froschrectus-Präparat ergab eine ausreichende Übereinstimmung. Die Differenz (Tab. 2) erklärt sich durch zusätzlichen Zerfall des Acetylcholins während der Bebrütungsperiode. Dieser Fehler kann jedoch leicht durch gleichzeitiges Ansetzen von Kulturen mit bekanntem Acetylcholingehalt

bestimmt und dadurch eliminiert werden. Die Methode erlaubt es, mit sehr kleinen Substratmengen zu arbeiten. Wir benutzten im allgemeinen ein Reaktionsgemisch, in dem sich Acetylcholin in einer Konzentration von etwa 12 γ/ml befand. Bei den bisher angewandten Methoden lag die Substratkonzentration bei etwa 1—3 mg/ml (Ammon) und 2—3 mg/ml (Meyer u. Wilbrandt). Obwohl wir uns bei unseren Versuchen nicht im optimalen Konzentrationsbereich befanden, war die Spaltungsgeschwindigkeit zur Beurteilung von Aktivitätsunterschieden ausreichend. Über die Acetylcholinkonzentration, die an umschriebenen Stellen in vivo

Tabelle 3. *Cholinesteraseaktivität im Mäusegehirn nach Injektion von Mintacol und Vorbehandlung mit Atropin*
Bestimmung nach der Methode von Ammon

Normal	30 min		24 Std	
	Mintacol 0,60 mg/kg		Mintacol 0,60 mg/kg	
	unvorbehandelt	Atropin	unvorbehandelt	Atropin
	μ Mol Acetylcholin/g/Std			
690	50	86	298	280
658	63	70	274	249
665	54	97	264	248
658	59	136	248	267
700	140	139	250	261
	77	206	291	
	81	202	293	
	83	130	296	
	49	138		
	56	180		
$M \pm \sigma$ 674 $\pm$ 20	71 $\pm$ 27	138 $\pm$ 47	277 $\pm$ 21	261 $\pm$ 13
		$t = 3{,}9$ $P = 0{,}001$		$t = 1{,}7$ $P = 0{,}1$

Acetylcholinkonzentration: $4 \cdot 10^{-3}$ Mol. Die Fermentlösung enthielt jeweils 30 bzw. 60 mg Gewebe (Feuchtgewicht)/3 ml. Jede Zahl stellt einen Mittelwert von 3—4 Mäusegehirnen dar. Atropingabe (120 mg/kg) 20 min vor der Mintacol-Applikation. Die Esteraseaktivität wurde 30 min bzw. 24 Std nach der Injektion des Cholinesterasegiftes bestimmt. 35° C, 95% N_2, 5% CO_2.

entstehen kann, ist kaum etwas zu erfahren. Es ist jedoch durchaus wahrscheinlich, daß die Acetylcholinesterase auch im Organismus nicht bei einer Substratkonzentration von etwa $5 \cdot 10^{-3}$ mol (bei der Serumcholinesterase sogar noch höher!) arbeitet.

Als Nachteil ist anzusehen, daß die Wachstumsperiode unter Umständen längere Zeit beansprucht (bis zu 8 Tagen). Auch zur Bestimmung der Esteraseaktivität im Gehirn ist die Methode nicht besonders geeignet, da der schwankende und teilweise recht hohe Cholingehalt des Organs

die Austestung stört. Man ist daher gezwungen, die im Hirnesterasepräparat selbst vorhandene Cholinmenge in Parallelversuchen zu bestimmen. Unter Umständen ist dann eine ganze Versuchsserie zu verwerfen (wenn der Cholingehalt über 2—6 γ/ml Fermentlösung beträgt). Wir haben daher an Esterasepräparationen von Gehirnen ergänzende Untersuchungen mit der manometrischen Methode nach Ammon durchgeführt.

Die Beeinflussung der Vergiftungssymptome nach Applikation von Cholinesterasegiften durch Atropin ist mehrfach untersucht worden. Die Befunde sind nicht ganz einheitlich. Während von der Mehrzahl der Untersucher ein deutlicher Antagonismus gefunden wurde, glaubten Heymans u. Jakob (1947) keinen krampfhindernden Effekt zu sehen. Es wurde auch an eine unspezifische, gegen alle Krampfstoffe gerichtete Wirkung gedacht, nachdem Longino u. Preston (1946) bei der Maus auch — mit allerdings extrem hohen Dosen — Strychninkrämpfe verhindern konnten. Allerdings sind diese Befunde von Koppanyi (1939) an Hunden und Katzen nicht bestätigt worden. Dieser Autor sah eher eine synergistische als antagonistische Wirkung. Auch in neueren Untersuchungen, die Karczmar u. Koppanyi (1953) an Larven und Embryonen von Amblystoma punctatum durchführten, konnte durch Atropin keine Schutzwirkung gegenüber DFP-Konvulsionen erzielt werden.

Die Verminderung der Toxicität von Mintacol durch das Atropin führt Wirth (1949) auf eine Blockierung der lebenswichtigen vegetativen Nervenendigungen zurück. Das freigesetzte Acetylcholin soll dann an den Receptoren nicht zur Wirkung kommen. Diese Ansicht wird heute von den meisten Autoren geteilt.

Eine Wirkung des Atropins auf die Cholinesterase selbst und eine Veränderung der Prostigminwirkung auf das Enzym schien nach den Untersuchungen von Frey (1948) nicht vorhanden zu sein. Diese Befunde erscheinen jedoch nicht sehr wahrscheinlich, nachdem Maier (1953), Maier u. Fischer (1953), Hardegg, Rieken u. Schmalz (1953, 1954) sowie Hardegg, Dohrmann u. Bechinger (1955) zeigen konnten, daß die hemmende Wirkung des Prostigmins auf die menschliche Serumesterase in vitro durch Zugabe von Atropin zu dem Reaktionsgemisch abgeschwächt und in hohen Dosen fast aufgehoben wird. Hardegg u. Mitarb. dehnten diese Untersuchungen auch auf die menschliche Erythrocytenesterase aus, fanden hierbei jedoch, daß die durch Prostigmin erzeugte Fermenthemmung im Gegensatz zur Serumcholinesterase nicht merklich vermindert wird. Die Verfasser schließen hieraus, daß dem Atropin nur gegenüber der Serumcholinesterase eine Wirkung zukommt, während bei der Acetylcholinesterase, also an den Erythrocyten, im Gehirn und im Muskel kein Effekt vorhanden sein soll.

Bei unseren jetzt durchgeführten Experimenten konnte in vivo kein wesentlicher Unterschied zwischen den Wirkungen auf die Esterasen in den verschiedenen Organen gefunden werden. Die von uns applizierten Atropindosen lagen jedoch auch sehr hoch. Durch Atropin-Vorbehandlung konnte sowohl die Hemmung der Serumcholinesterase durch Diäthyl-p-Nitrophenylphosphat als auch der Effekt auf die Erythrocyten- und Gehirnesterase abgeschwächt werden. Dies ließ sich sowohl mit der mikrobiologischen als auch mit der manometrischen Methode (Ammon) zur Bestimmung der Esteraseaktivität zeigen.

Hirngewebe enthält nach den übereinstimmenden Angaben der Literatur bei allen Tieren ganz überwiegend die Acetylcholinesterase (Nachmansohn u. Rothenberg 1945). Wahrscheinlich herrscht im Serum die „Pseudoform" vor, während in

den Erythrocyten vorwiegend die „echte Esterase" lokalisiert ist. Allerdings zeigen Befunde von Davies u. Rutland (1956), daß — jedenfalls in Rattenerythrocyten — auch erhebliche Mengen einer „Butyro-Cholinesterase" vorkommen.

Bei der von uns verwendeten Versuchsanordnung ist die Möglichkeit, daß die Wirkung des Atropins bei der Gehirnesterase erst in vitro nach dem Homogenisieren auftritt, nicht ganz auszuschließen. Wir halten eine derartige Deutung aber nicht für sehr wahrscheinlich.

Der Schutzeffekt des Atropins an den Cholinesterasen läßt sich mit einer entsprechenden Wirkung des Eserins vergleichen. Schon 1946 hatten Koster sowie Koelle gezeigt, daß durch prophylaktische Gabe von Eserin die Toxicität von DFP abgeschwächt werden kann. Wirth sowie Salerno u. Coon (1950) wiesen ein ähnliches Verhalten auch bei der Vergiftung mit Mintacol nach. Es soll zu einer reversiblen Bindung des Eserins oder des analog wirkenden Prostigmins an die Cholinesterase kommen, und das Ferment so vor der irreversiblen Hemmung durch Alkylphosphate geschützt werden. Eine ähnliche Wirkung beschrieben kürzlich Koff u. Coon (1957). Danach kann auch durch Benzochinon, einer Verbindung, die ebenfalls selbst die Cholinesterase hemmt, die Toxicität von TEPP (Tetraäthylpyrophosphat) verringert werden.

Der Mechanismus der Wirkung des Atropins an der Cholinesterase ist damit von dem des α-Hexachlorcyclohexans (Coper, Herken u. Klempau 1951; Herken u. Neubert 1953), mit dem es ebenfalls gelingt, die Toxicität von Alkylphosphaten herabzusetzen, grundsätzlich verschieden. Im Gegensatz zum Atropin muß beim α-HCH eine Reaktivierung des bereits gehemmten Enzymes angenommen werden (Neubert u. Schaefer 1957). Eine derartige Wirkung kann das Atropin nicht entfalten, da hier wie beim Eserin nur durch eine prophylaktische Gabe ein Schutzeffekt an der Esterase erzielt wird, und bei Applikation nach der Mintacolgabe die Hemmung der Esterase nicht vermindert wird.

Aus unseren Versuchen ziehen wir den Schluß, daß Atropin nicht nur an den vegetativen Receptoren eine Schutzwirkung gegenüber Cholinesterasegiften entfalten kann, sondern daß bei ausreichend hoher Dosierung in geringerem Maße auch eine Schutzwirkung an den Cholinesterasen selbst auftreten kann, zu denen das Atropin ja ebenfalls eine gewisse Affinität besitzt.

Bei der Vergiftung des Menschen mit Cholinesterasegiften dürfte dieser Effekt des Atropins jedoch von untergeordneter Bedeutung sein, da die benötigten Dosen sehr hoch liegen und wohl nur von Nagetieren vertragen werden.

Summary

1. A method is presented by which cholinesterase-activity can be tested. Using a cholineless mutant of neurospora crassa (34486 ATCC 9277) this method is based on the microbiological estimation of choline formed during enzymatic hydrolysis of acetylcholine. The procedure allows to measure hydrolysis in the range of 10 γ acetylcholine.

2. The influence has been established that pretreatment with atropine causes on the inhibition of cholinesterases in mice. High doses of atropine are able to protect parts of serumcholinesterase and of esterase of erythrocytes and brain against inhibition. In addition to the effect of atropine on peripheral receptors an action on esterases has been demonstrated.

Literatur

Alles, G. A., and R. C. Hawes: J. of Biol. Chem. **133**, 375 (1940).
Ammon, R.: Pflügers Arch. **233**, 486 (1934).
Appleton, H. D., and B. N. LaDu: Biochemic. J. **215**, 803 (1953).
Augustinsson, K. B.: The Enzymes, I, 1, New York 1950.
Chang, H. L., and J. H. Gaddum: J. of Physiol. **79**, 255 (1933).
Coper, H., H. Herken u. I. Klempau: Naturwissenschaften **38**, 69 (1951).
Davies, D. R., and J. P. Rutland: Nature (Lond.) **178**, 697 (1956).
Frey, E.: Arch. exper. Path. u. Pharmakol. **205**, 137 (1948).
Führer, H.: Arch. exper. Path. u. Pharmakol. **82**, 51 (1918).
György, P.: Vitamin Methods I, New York 1950.
Hardegg, W., R. Dohrmann u. D. Bechinger: Arch. exper. Path. u. Pharmakol. **224**, 55 (1955).
Hardegg, W., E. Rieken u. H. Schmalz: Biochem. Z. **324**, 115 (1953). — Pflügers Arch. **259**, 317 (1954).
Herken, H., H. Kewitz u. I. Klempau: Arch. exper. Path. u. Pharmakol. **215**, 217 (1952).
Herken, H., u. D. Neubert: Arch. exper. Path. u. Pharmakol. **219**, 223 (1953).
Hestrin, S.: J. of Biol. Chem. **180**, 249 (1949).
Heymans, C., u. J. Jakob: Arch. internat. Pharmacodynamie **74**, 233 (1947).
Horowitz, N. H., and G. W. Beadle: J. of Biol. Chem. **150**, 325 (1943).
Karczmar, A., u. T. Koppanyi: Arch. exper. Path. u. Pharmakol. **219**, 263 (1953).
Koelle, G. B.: J. Pharmacol. a. Exper. Ther. **88**, 232 (1946).
Koff, G. Y., and J. M. Coon: Federat. Proc. **16**, 313 (1957).
Koppanyi, T.: Proc. Soc. Exper. Biol. a. Med. **40**, 244 (1939).
Koster, R.: J. Pharmacol. a. Exper. Ther. **88**, 39 (1946).
Lang, K.: Biochem. Z. **290**, 289 (1937).
Longino, F. H., and R. Preston: J. Pharmacol. a. Exper. Ther. **86**, 174 (1946).
Maier, E. H.: Klin. Wschr. **1953**, 573.
Maier, E. H., u. R. Fischer: Z. klin. Med. **151**, 75 (1953).
Marquardt, P., u. G. Vogg: Zschr. physiol. Chem. **191**, 143 (1952).
Meyer, A., u. W. Wilbrandt: Helvet. physiol. Acta **12**, 206 (1954).
Nachmansohn, D., and M. A. Rothenberg: J. of Biol. Chem. **158**, 653 (1945).
Neubert, D., u. J. Schaefer: Arch. exper. Path. u. Pharmakol (im Druck).
Salerno, P. R., u. J. M. Coon: Arch. internat. Pharmacodynamie. **84**, 227 (1950).
Werle, E., u. H. Uebelmann: Arch. exper. Path. u. Pharmakol. **189**, 421 (1938).
Wirth, W.: Arch. exper. Path. u. Pharmakol. **207**, 547 (1949).

Dr. Diether Neubert, Pharmakolog. Institut der Freien Universität
Berlin-Dahlem, Thielallee 69/73

Arch. exper. Path. u. Pharmakol., Bd. 233, S. 173—183 (1958)

Aus dem Pharmakologischen Institut der Freien Universität Berlin

Geschlechtsspezifische Unterschiede in der Entgiftung von Evipan und Thiopental bei Ratten

Von
H. Remmer

Mit 4 Textabbildungen

(Eingegangen am 22. Oktober 1957)

Männliche Ratten sind gegen einige Pharmaka resistenter als weibliche. Vom Alter und Geschlecht der Ratte ist z. B. die Dauer der Evipannarkose abhängig. Weibliche Ratten schlafen nach Evipan 3—4mal solange wie die männlichen. Holck (1937) untersuchte als erster dieses merkwürdige Verhalten und teilte mit, daß die Abhängigkeit der Narkosedauer vom Geschlecht den Ratten allein eigentümlich ist, nicht aber bei anderen Tierarten vorkommt. Nur bei Applikation verschiedener kurz wirksamer Barbitursäurederivate sei der Effekt zu beobachten. Vorbehandlung mit Testosteron verkürzt, mit Oestradiol aber verlängert die Evipan- oder Pentobarbitalnarkose kastrierter Ratten (Robillard u. Mitarb. 1954; Pellerin u. Mitarb. 1954; Buchel 1954; Streicher u. Garbus 1955).

Diese und ähnliche Barbiturate werden bekanntlich in der Leber entgiftet. In den Mikrosomen der Leberzellen ist ein Fermentsystem vorhanden, das Evipan abzubauen vermag. Nach einer kurzen Mitteilung von Quinn, Axelrod u. Brodie (1954) soll das Geschlecht der Ratte die in vitro-Aktivität dieser Fermente beeinflussen. Langdauernde Testosteronbehandlung weiblicher Ratten führe zu einer Aktivitätssteigerung der Evipan oxydierenden Fermente.

Über den Effekt des Geschlechtes auf den in vitro-Abbau von Barbituraten sind bisher erst zwei Untersuchungen bekannt geworden, neben der oben bereits zitierten noch eine andere, in welcher die Oxydation von Pentobarbital durch Leberschnitte geprüft wurde (Robillard, D'Orio u. Pellerin 1954).

Deshalb begannen wir mit Versuchen, welche die bisher recht dürftigen Angaben über den Einfluß des Geschlechtes auf den Abbau von Evipan in vitro bestätigen sollten, und erweiterten die Experimente auf die Thiobarbitursäure Pentothal (Thiopental, Trapanal), um die beiden bekanntesten Kurznarkotica vergleichen zu können.

Methodik

Bei der Bestimmung der Narkosedauer wurde das Auftreten der Stellreflexe als Ende der Narkose registriert.

Die in vitro Versuche wurden wie folgt vorgenommen: In leichter Äthernarkose wurde der Ratte sofort nach Entbluten die Leber entnommen, von der dann

Schnitte mit einem Trockengewicht von insgesamt 35—45 mg angefertigt wurden. Diese kamen sofort in 5 ml Phosphat-Ringer-Lösung im Verhältnis 15:85 mit einem p_H von 7,4. Die Ringer-Lösung enthielt 200 mg-% Glucose und 250 oder 500 γ des abzubauenden Barbiturates. Die Inkubationslösungen wurden in 25 ml Erlenmeyer-Kölbchen bei 37° und reiner O_2-Begasung $^1/_2$—2 Std geschüttelt. Kaninchenleberhomogenat wurde durch Homogenisieren von 1 T. Leber und 2 T. Phosphatpuffer (0,15 molar; p_H 7,4) im Potter-Elvehjem-Homogenisator bereitet. Die Hälfte des Homogenisates wurde bei 9000 × g 20 min zentrifugiert und die überstehende Lösung als „Supernatant" verwendet. Zu 3 ml Homogenat oder Supernatant fügten wir nach den Angaben von Cooper u. Brodie (1955) $0{,}3 \cdot 10^{-6}$ Mol TPN, $25 \cdot 10^{-6}$ Mol $MgSO_4$ und $100 \cdot 10^{-6}$ Mol Nicotinsäureamid hinzu. Dazu kamen 250 oder 500 γ Evipan. Mit Puffer wurde auf 5 ml aufgefüllt. Bei 37° wurden die Erlenmeyer-Kölbchen 1 Std geschüttelt.

Evipan wurde nach der Methode von Brodie u. Mitarb. (1953) bestimmt. Genauere Ergebnisse mit einem geringeren Fehler ließen sich erzielen, als dieses Verfahren folgendermaßen modifiziert wurde: Die gesamte Lösung (5 ml) zusammen mit den Schnitten wurde nach Zusatz von 5 ml $^1/_2$ mol Phosphatpuffer p_H 5,5 oder p_H 7,0 mit 20 ml Petroläther, der 1,5 Isoamylalkohol enthielt, in Zentrifugengläsern extrahiert, die etwa 40 ml faßten und mit Schliffstopfen verschließbar waren. Sämtliche Gläser einer Versuchsreihe rotierten langsam 60 min in einem Gestell. Nach der Extraktion wurde zentrifugiert um eine scharfe Trennung zwischen den beiden Phasen zu erzielen. Die gesamte Menge oder ein aliquoter Teil der Petrolätherphase wurde abgehoben und wiederum in einem kleineren Zentrifugenglas mit 4 ml alkalischem Phosphatpuffer (p_H 10,7) extrahiert, indem die Gläser 5 min schnell rotierten. Nach scharfem Zentrifugieren wurde der oben stehende Petroläther abgesaugt und die wäßrige Phase im Spektrophotometer gemessen. Das Absorptionsmaximum von Evipan liegt bei 243—244 mμ. Als Maß für die Konzentration war es günstiger, die Extinktionsdifferenz zwischen 244 und 255 mμ oder zwischen 244 und 270 mμ zu ermitteln, da der Leerwert bei 244 mμ schwankte. Verunreinigungen aus dem Petroläther und mitextrahierte Substanzen konnten die Absorption in diesem Bereich erhöhen. Die Extinktionsdifferenz des Leerwertes war dagegen so gering, daß sie einem Evipangehalt von nicht mehr als 1—2 γ entsprach.

Wenn, wie in der oben beschriebenen Versuchsanordnung, das Volumen des Petroläthers zu derjenigen der wäßrigen Phase sich wie 2:1 verhielt, konnten bei einem p_H von 5,5 nur 86% des Evipans bei Zimmertemperatur extrahiert werden; wurde der p_H-Wert auf 7,0 erhöht, konnten nur 80% gewonnen werden. Auf eine nahezu vollständige Extraktion wurde verzichtet, da, um 97% Evipan extrahieren zu können, 10 Teile Petroläther für 1 Teil Wasser wäßrige Phase nötig waren.

Deshalb wurde in jeder Versuchsreihe eine bestimmte Menge Evipan als Standard analysiert, wobei streng die gleichen Versuchsbedingungen eingehalten wurden, um das gleiche Verteilungsverhältnis von Evipan sowohl im Standard als auch in den zu messenden Proben zu gewährleisten.

Cooper u. Brodie (1955) konnten nachweisen, daß mit diesem Verfahren nur Evipan, nicht aber die Abbauprodukte bestimmt werden. Diejenigen Substanzen, die bei der Oxydation und Demethylierung von Evipan entstehen, sind stärkere Säuren als ihre Ausgangsprodukte. Bei der Oxydation einer Methylengruppe entsteht eine Carbonylgruppe mit elektronegativem Charakter. Desgleichen wird durch Demethylierung des N im Barbituratring die saure Eigenschaft der benachbarten Carboxylgruppen wachsen und dadurch die Dissoziation der Substanz erhöhen. Mit dieser theoretischen Vorstellung stimmten auch Löslichkeitsbestimmungen des Evipans und seiner Abbauprodukte von Bush u. Mitarb. (1953) in

organischer und wäßriger Phase überein: In folgender Reihenfolge nimmt die Wasserlöslichkeit gegenüber der Löslichkeit im organischen Lösungsmittel zu:

Evipan < Norevipan < Ketoevipan < Ketonorevipan.

Die Wasserlöslichkeit wächst mit steigender Dissoziation der Substanz.

Um wirklich sicher zu gehen, daß Abbauprodukte auch nicht zu einem kleinen Prozentsatz in die Petrolätherphase eingehen, erhöhten wir daher den p_H-Wert der wäßrigen Phase auf 7,0. Dadurch wurde vom Evipan statt 86% nur noch 80% ± 1,5% gewonnen, aber gleichzeitig die Extraktionsmöglichkeit für die stärker sauren Verbindungen noch weiter verschlechtert. Wenn Axelrod, Reichenthal u. Brodie (1954) bei einem p_H von 5,5 und einem Überschuß der Petrolätherphase von 20:1 gezwungen sind, 2 mal mit $^1/_5$ des Volumens von gleichen Phosphatpuffer zu waschen, um ein Umsetzungsprodukt des Evipans zu entfernen, so kann man sich diesen Schritt bei der Analyse ersparen, wenn man, wie in der eigenen Versuchsanordnung, auf eine nahezu vollständige Extraktion verzichtet und in der beschriebenen Weise verfährt.

Trapanal bestimmten wir ähnlich wie Evipan und hielten uns ebenfalls an die Vorschrift von Brodie u. Mitarb. (1950): 5 ml der Inkubationslösung und die gleiche Menge 1,5 mol NaH_2PO_4 wurden mit 40 ml Petroläther, der 1,5% Isoamylalkohol enthielt, 60 min in der gleichen Weise wie Evipan extrahiert. Zur Extraktion in Alkali dienten 4 ml 2,5 n NaOH. Trapanal hatte ein Absorptionsmaximum bei 304,5 mμ. Die Extinktion bei dieser Wellenlänge diente als Maß für die Konzentration. Brodie behandelte 2 min lang den Petrolätherextrakt mit $^1/_2$ Vol 1,5 mol NaH_2PO_4, um das Abbauprodukt zu entfernen. In der eigenen Versuchsanordnung war diese zusätzliche Extraktion nicht erforderlich. Auch Winters u. Mitarb. (1955) überzeugten sich davon, daß ein Waschen mit Phosphatpuffer unnötig war. In einigen Versuchen mit höheren Trapanalabbau fanden wir bestätigt, daß das Waschen des Petrolätherextraktes den Meßwert kaum veränderte. Unter den angegebenen Bedingungen wurde eine praktisch vollständige Extraktion des Trapanals erzielt.

In einer Reihe von Evipanversuchen wurde nach der Inkubation und Extraktion ein Teil der Petrolätherphase wie üblich auf seinen Gehalt an Evipan untersucht, ein anderer wurde durch Einengen im Vakuum konzentriert und auf Whatman-Papier Nr. 3 zur Chromatographie aufgetragen. Als Lösungsmittelgemisch dienten:

1. Isopropanol: Chloroform: NH_3 25% = 4,5:4,5:1 nach Angaben von Deininger (1955),

2. Butanol gesättigt mit 1% NH_3 nach Cooper u. Brodie (1955).

Die 5 ml der wäßrigen Phase, die nach Petrolätherextraktion zurückblieben, wurden angesäuert und mit 20 ml Chloroform 3 mal extrahiert. Mit Pufferlösung vom p_H 10,7 wurde der Chloroformextrakt ausgeschüttelt, darauf wiederum angesäuert, mit Chloroform extrahiert und nach Einengen auf das Papier gebracht. Auf diese Weise war es möglich, die Abbauprodukte des Evipans ohne Störung durch Begleitsubstanzen papierchromatographisch sehr gut zu trennen.

Die markierten Stellen wurden in einigen Versuchen herausgeschnitten. Jede Fraktion wurde dann mit 3 ml Phosphatpuffer p_H 10,7 eluiert und spektrophotometrisch analysiert. Als Leerwert diente die Elutionsflüssigkeit eines gleichgroßen Papierstückes, das unterhalb der markierten Fraktionen aus dem Papier herausgeschnitten wurde und das kein Barbiturat enthielt.

Ergebnis

1. Der Abbau des Evipans durch Leberschnitte. Um zu prüfen, welche Abbauprodukte bei der Inkubation von Evipan mit Leberschnitten auftreten und um außerdem zu kontrollieren, ob die benutzte Methode für

Evipan streng spezifisch ist, versuchten wir die Substanzen, die aus Evipan entstehen, papierchromatographisch zu trennen und, wenn möglich, zu identifizieren. Im Petrolätherextrakt war nur eine Substanz, Evipan, vorhanden, die kurzwelliges UV-Licht absorbierte und dadurch photographiert werden konnte. Außerdem war sie mit $Hg(NO_3)_2$ schwarzgrau anfärbbar. Der R_f-Wert betrug bei Benutzung des oben unter 2. angegebenen Lösungsmittels 0,9.

Im Chloroformextrakt waren stets drei Substanzen bei Betrachtung mit einer Minerallicht-UV-Lampe erkennbar. Die am schnellsten wandernde A ($R_f = 0{,}9$) erschien hellblau auf dunkelblauem Grund, während die beiden langsamer laufenden Verbindungen B und C sich tief violett abhoben. Ihr R_f-Wert betrug für B 0,58 und für C 0,38. Alle drei Substanzen absorbierten das UV-Licht einer Vakuum-Hg-Lampe und konnten so photographiert werden, wie Abb. 1 zeigt. Mit $Hg(NO_3)_2$-Färbung ließen sich nur die beiden langsamer wandernden Komponenten B und C als dunkelgraue Flecke sichtbar machen (Abb. 1). Dabei fiel auf, daß die Substanz B in vielen Versuchen mit $Hg(NO_3)_2$ anfärbbar war, während die UV-Absorption zum Nachweis nicht ausreichte. Umgekehrt verhielt es sich mit der Substanz C, die in allen Fällen im UV-Licht besser sichtbar gemacht werden konnte als durch Anfärben mit $Hg(NO_3)_2$.

Abb. 1. Papierchromatogramm der Abbauprodukte des Evipans. Nach Durchschneiden des Papierstreifens wurde die rechte Hälfte mit UV-Licht photographiert, die linke mit $Hg(NO_3)_2$-Lösung behandelt. Da die bleigraue Färbung sehr schnell abblaßt, wurden die Flecken mit dem Bleistift nachgezeichnet

1 mg Evipan wurde 1 Std mit Rattenleberschnitten inkubiert, die ein Trockengewicht von 35 mg besaßen. Nach Extraktion der gesamten, die Schnitte enthaltenden Inkubationsflüssigkeit (5 ml) mit 40 ml Petroläther konnten mit der üblichen Methode 690 γ Evipan nachgewiesen werden. 310 γ waren abgebaut. Außer Evipan waren im Petrolätherextrakt papierchromatographisch keine anderen Verbindungen nachweisbar. Die wäßrige Phase wurde nach dem oben beschriebenen Verfahren aufbereitet. Im Chromatogramm waren wieder die 3 erwähnten Komponenten nachweisbar (Abb. 1). Die drei Verbindungen wurden dann eluiert. Die Absorption der Substanz A war sehr schwach: ein unscharfes Maximum befand sich zwischen 235—240 mμ. Dagegen besaßen B und C eine starke Absorption mit dem typischen Spektrum der Barbiturate. Das Maximum von B lag bei 244,5 mμ, das von C bei 240 mμ.

Bezieht man die gemessenen Extinktionsdifferenzen der 3 Substanzen auf den Evipanstandard, so enthielt die wäßrige Phase von der Substanz A 20 γ; B 70 γ; C 120 γ. Dieses Verfahren ist zulässig, da in der Stärke der Absorption die verschiedenen Barbitursäurederivate nur wenig differieren.

Mit der Substanz A, die sich auf dem Papier nicht wie eine Barbitursäure verhielt, aber den gleichen R_f-Wert besaß wie Evipan, wanderte sicher eine kleine Menge dieser Verbindung. Auf Grund der Verteilung des Evipans zwischen Petroläther und Wasser sollte man bis zu 40 γ Evipan in der wäßrigen Phase erwarten.

Zweifellos waren die beiden Substanzen B und C Barbitursäurederivate. Dafür sprach das Absorptionsspektrum und die Anfärbbarkeit mit $Hg(NO_3)_2$.

Von insgesamt 300 γ Evipan, die in diesem Versuch abgebaut wurden, konnten rund $^2/_3$ gefunden werden. Das fehlende Drittel entging dem Nachweis. Wahrscheinlich handelt es sich dabei nicht um ein Abbauprodukt mit intaktem Barbituratring, da die Empfindlichkeit der Nachweismethode die Entdeckung einer solchen Verbindung möglich gemacht hätte. Nur Spuren von solchen Substanzen könnten vorhanden sein, aber niemals eine Fehlmenge von 100 γ erklären. Ob die Zerstörung des fehlenden Drittels bereits während der Inkubation erfolgte oder erst bei der Aufarbeitung, läßt sich nicht aussagen.

Tabelle 1
Altersabhängigkeit der Narkosedauer nach 100 mg/kg Evipan i.p.

Geschl.	Tierzahl	Gewicht g	Narkosedauer in Minuten
♀	10	60 ± 5	45 ± 15
♀	6	110 ± 5	125 ± 33
♂	6	110 ± 5	29 ± 3
♂	5	220 ± 10	50 ± 6,5

Tabelle 2. *Dauer der Evipan- und Thiopentalnarkose männlicher und weiblicher Ratten*

	Evipan				Thiopental			
Geschl.	Dosis mg/kg	n*	Gewicht g	Narkosedauer in Minuten	Dosis mg/kg	n*	Gewicht g	Narkosedauer in Minuten
♀	100 i.p.	27	140 ± 5	115 ± 22	60 i.p.	11	190 ± 10	250 ± 73
♂	200 i.p.	25	160 ± 20	65 ± 21	60 i.p.	12	185 ± 10	240 ± 75
♀	80 i.v.	10	125 ± 5	50 ± 13	30 i.v.	13	135 ± 10	76 ± 20
♂	80 i.v.	11	130 ± 5	17 ± 5	30 i.v.	14	140 ± 8	66 ± 4

* n = Zahl der Ratten

2. Der Einfluß des Geschlechtes auf den in vitro-Abbau von Evipan und Thiopental. Bei weiblichen Ratten dauert die Narkose nach Evipan i.p. 4mal so lange wie bei männlichen (Tab. 1 u. 2). Noch nicht geschlechtsreife weibliche Ratten „schlafen" kürzer als erwachsene. Bei älteren männlichen Ratten steigt die Narkosedauer etwas an (Tab. 1).

Nach Thiopental (Trapanal) 60 mg/kg i.p. dagegen beobachtet man keinen Unterschied bei männlichen und weiblichen Ratten. Die Narkose

hält bei beiden Geschlechtern 4 Std an, während die Evipannarkose weiblicher Tiere mit einer fast doppelt so hohen Dosis von 100 mg/kg i.p. bereits nach 2 Std beendet ist.

Entsprechend bauen in vitro-Leberschnitte männlicher Ratten etwa doppelt so viel Evipan ab wie diejenigen weiblicher Tiere (Abb. 2). Dagegen unterscheiden sie sich *nicht* in der Entgiftung von Thiopental. Um die Abbaugeschwindigkeit von Evipan und Thiopental miteinander vergleichen zu können, wurden unter den gleichen Bedingungen Schnitte derselben Rattenleber mit Evipan und Trapanal inkubiert. Vom Thiopental wurden etwa 10% abgebaut, gleichgültig, ob die Schnitte von männlichen oder weiblichen Ratten stammten, während Schnitte weiblicher Ratten 30—40% Evipan oxydierten (Abb. 3). Bis auf 70—80% stieg der Abbau durch Leberschnitte männlicher Tiere.

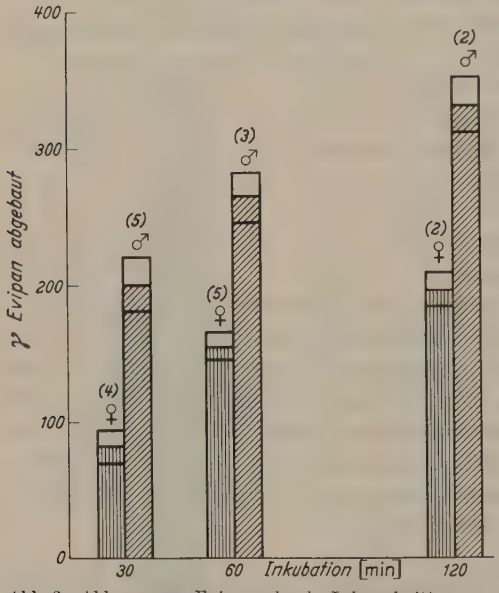


Abb. 2. Abbau von Evipan durch Leberschnitte von Ratten, 5 ml Phosphat-Ringer-Lösung p_H 7,4, 500 γ Evipan, 50 mg Schnitte (Trockengewicht), O_2-Begasung; Inkubation bei 37° [(2) Tierzahl]

3. Hemmung des Evipanabbaues. Wie Axelrod u. Mitarb. (1954) zeigten, läßt sich der Abbau von Evipan in vitro durch den Diphenylpropylessigsäureester des Diäthylaminoäthanols (SKF 525) hemmen. Neubert u. Herken (1955) fanden, daß eine ähnliche Substanz, der Phenyldiallylessigsäureester des gleichen Alkoholes die Evipannarkose der Ratte erheblich verlängerte. Deshalb prüften wir, ob diese Substanz ebenfalls in der Lage ist, einen hemmenden Einfluß auf den Abbau des Evipans auszuüben. Wurden von Ratten, die 60 min vor der Tötung 50 mg/kg dieser Substanz i.p. erhielten, Leberschnitte angefertigt, dann sank die Oxydation des Evipans ab (Abb. 4).

4. Der in vitro-Abbau durch Kaninchenleber. Nach Axelrod (1955b) wird beim Homogenisieren der Rattenleber ein Faktor freigesetzt, der den Abbau von Evipan hemmt. In der Kaninchenleber soll ein solcher Faktor nicht vorhanden sein. Deshalb fertigten wir von derselben Leber eines Kaninchenbockes Schnitte, Homogenat und Plasmafraktion an, um die Entgiftung von Evipan und Thiopental miteinander vergleichen

zu können (Tab. 3). Die Plasmafraktion baute vom Evipan etwa 90% ab, vom Thiopental dagegen nur 20%. Ähnlich verhielten sich Leberschnitte.

Diskussion

Wie die eigenen Versuche zeigen, erfolgt der Abbau von Thiopental sowohl durch Ratten- als auch Kaninchenleber wesentlich langsamer als von Evipan. Die viel längere Wirkung des Thiopentals bei der Ratte

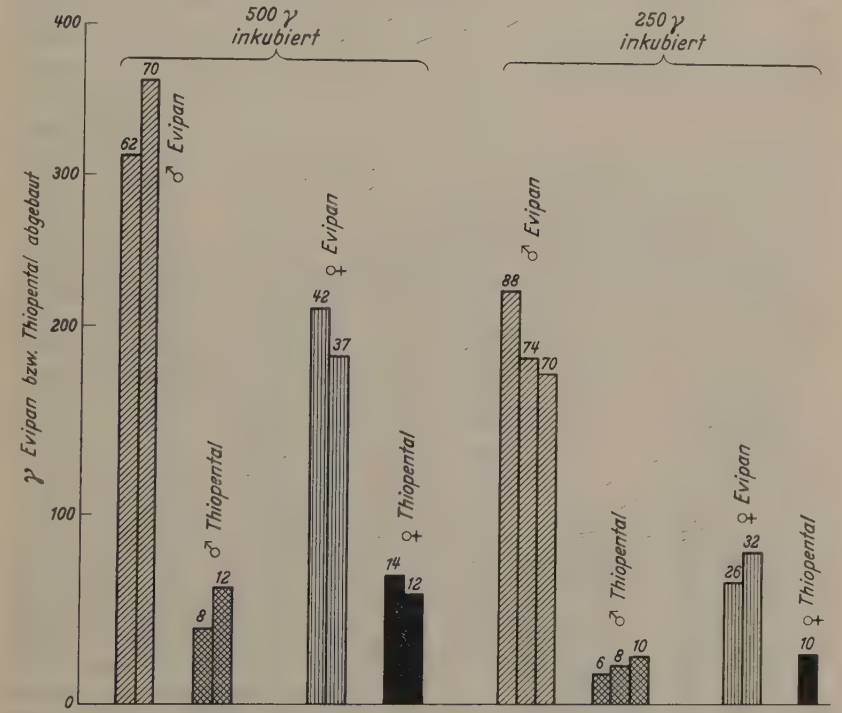


Abb. 3. Abbau von Evipan und Thiopental durch Schnitte der gleichen Rattenleber, 2 Std inkubiert. (Zahlen über den Säulen geben den Abbau in Prozent der inkubierten Menge)

findet dadurch ihre Erklärung. Für die Wirkungsdauer eines Barbitursäurederivates ist nicht nur die Abbaugeschwindigkeit von Bedeutung, sondern, wie Brodie u. Mitarb. (1950 u. 1953) bewiesen, auch die Löslichkeit im Fettgewebe. Darüber hinaus spielt bei der Kurznarkose die Geschwindigkeit eine große Rolle, mit der diese Substanzen sich mit den Wirkgruppen verbinden (Bush 1953; Remmer 1957). Leberzellplasma von Kaninchen, welches nur Mikrosomen enthält, und Leberschnitte bauen Evipan gleich gut ab. Dagegen wird Thiopental durch Schnitte offenbar besser entgiftet als durch Homogenat oder durch Zellplasma. Die Versuche bestätigen, daß für den Evipanabbau Fermente, die im Zellplasma vorhanden sind, ausreichen. Dagegen spielen beim

Tabelle 3. *Abbau von Evipan und Thiopental durch Kaninchenleber*

	Schnitte		Homogenat		Supernatant	
ursprüngliches Lebergewicht g	0,6		1,2		1,2	
Inkubationslösung ml	5,2		5,6		5,6	
zugesetzt	250 γ		500 γ		500 γ	
	Evip.	Thiop.	Evip.	Thiop.	Evip.	Thiop.
gefunden γ	30	170	172	417	37	406
abgebaut γ	220	80	328	83	463	94
%	88	32	66	17	93	19

Thiopentalabbau wahrscheinlich noch andere Reaktionen eine Rolle, die nur in der intakten Zelle möglich sind.

Weil unverändertes Evipan nur in Spuren im Harn ausgeschieden wird, wurde lange Zeit die Meinung vertreten, daß dieses Barbitursäurederivat vollständig im Organismus aufgespalten wird. Erst Bush, Butler u. Dickinson (1953) versuchten die Abbauprodukte aus dem Urin zu isolieren. Vom Evipan und der demethylierten Substanz fanden sie nur Spuren. Dagegen entdeckten sie 5—6% vom oxydierten Norevipan, dem Ketonorevipan, und außerdem 1—2% der beiden Isomeren des Ketoevipans.

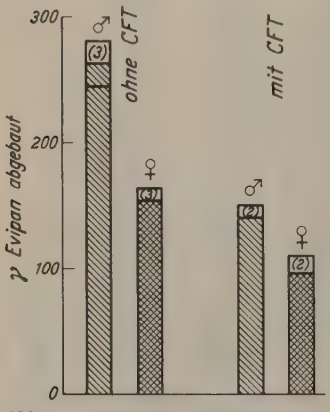


Abb. 4. Hemmung des Evipanabbaus durch den Phenyldiallylessigsäureester des Diäthylaminoäthanols (CFT-1201). Inkubation von Leberschnitten (35 mg Trockengewicht) mit 500 γ Evipan 1 Std lang. 50 mg/kg i.p. 45 bis 60 min vor Tötung der Ratten injiziert

Nur von Cooper u. Brodie (1955) sind bisher Untersuchungen über den Abbau des Evipans in vitro bekannt geworden. Kaninchenleberplasma, frei von Kernen und Mitochondrien, oxydierte Evipan nur zu einem Isomeren des Ketoevipans. Andere Abbauprodukte waren nicht nachweisbar. Die Menge der Metaboliten entsprach dem Evipanabbau.

In den eigenen Versuchen mit Leberschnitten von Ratten fanden wir regelmäßig 2 Abbauprodukte, die einen intakten Barbitursäurering besaßen und von denen wahrscheinlich die Substanz C, die in größerer Menge entstand, Ketoevipan ist, während die andere, die Substanz B, entweder Norevipan oder Ketonorevipan sein könnte. Das letztere ist nach Bush u. Mitarb. das Hauptausscheidungsprodukt. B war nämlich in vielen Chromatogrammen mit $Hg(NO_3)_2$ anfärbbar, in denen die UV-Absorption zum Nachweis nicht ausreichte. Die Substanz C dagegen war stets im UV-Licht besser sichtbar zu machen als durch Anfärbung mit $Hg(NO_3)_2$. Nach Deininger u. Stiebner (1955) reagieren bereits 5—10 γ Norevipan auf dem Papier mit $Hg(NO_3)_2$, während die Reaktion für

N-methylierte Barbiturate wesentlich unempfindlicher ist. Die Nachweisgrenze liegt bei 50 γ. Etwa $^1/_3$ des abgebauten Evipans war nicht wiederzufinden. Ein Teil davon dürfte bereits durch weiteren Abbau in der Leber so verändert worden sein, daß er als Barbitursäure nicht mehr nachweisbar war.

Über das Schicksal von Thiopental in vivo und vitro ist nicht viel mehr bekannt als über den Abbau von Evipan. Von Brodie u. Mitarb. (1950) wurde als Hauptausscheidungsprodukt eine Carboxylsäure des Thiopentals nachgewiesen. Wood u. Horning (1953) haben die Konstitution dieser Verbindung aufgeklärt. Außerdem entsteht neben der narkotisch unwirksamen Carboxylsäure durch Austausch von S gegen O das wirksame Pentobarbital (Winters, Shideman u. Mitarb. (1955). Dieses wird dann als oxydiertes Derivat ausgeschieden. Brodie u. Mitarb. konnten in ihren Versuchen beobachten, daß die Oxydation von Evipan ebenso wie die Demethylierung und Desaminierung anderer Pharmaka durch Enzyme erfolgt, die in den Mikrosomen des Zellplasmas lokalisiert sind. Für diese Reaktionen ist reduziertes TPN und O_2 erforderlich [Cooper, Brodie (1955); Axelrod (1955); La Du u. Mitarb. (1955)].

Wenn der in vivo- und in vitro-Abbau von Evipan unter dem Einfluß des Geschlechts der Ratte steht, dann ist die Annahme naheliegend, daß die Geschlechtshormone direkt oder indirekt dieses Enzymsystem beeinflussen. Quinn, Axelrod u. Brodie (1954) konnten die Aktivität dieses Systems durch Gaben von männlichem Keimdrüsenhormon 4 Wochen lang an weibliche Ratten verstärken.

Die eigenen Versuche mit Leberschnitten können diese These bestätigen. Um so erstaunlicher ist es, daß der Thiopentalabbau vom Geschlecht nicht beeinflußt wird.

Die Kanadier Robillard, D'Iorio u. Pellerin (1954) beobachteten nämlich deutliche Unterschiede der Narkosedauer, als sie Pentobarbital, die O-haltige analoge Barbitursäureverbindung, männlichen oder weiblichen Ratten injizierten. Diese Verbindung wurde ebenfalls durch Leberschnitte von männlichen Ratten schneller abgebaut als durch solche weiblicher Ratten. Wenn sich Thiopental anders verhält, dann weist diese Tatsache darauf hin, daß der Abbau der beiden verwandten Substanzen sehr verschieden sein muß. Erhebliche Unterschiede in der Entgiftungsgeschwindigkeit beider Verbindungen beobachteten Brodie u. Mitarb. (1953). Beim Hunde wird Pentobarbital schneller abgebaut als beim Menschen, gerade umgekehrt verhält es sich mit Thiopental. Offenbar wird Thiopental ohne Mitwirkung der besprochenen Mikrosomenfermente bei der Ratte entgiftet; andernfalls müßte sich der geschlechtsspezifische Einfluß geltend machen. Winters, Shideman u. Mitarb. (1955) konnten nach Inkubation von Thiopental mit Rattenleberbrei nachweisen, daß ein beträchtlicher Teil durch Austausch von S gegen O als Pentobarbital erscheint. Es ist möglich, daß bei der Ratte diese Umsetzung nur sehr langsam erfolgt und dem weiteren Abbau vorausgeht, daß aber die von Brodie beschriebene Oxydation zur Carboxylsäure von untergeordneter Bedeutung ist. Die Umwandlung von Thiopental in Pentobarbital könnte unabhängig von den Mikrosomenfermenten ablaufen. Eine solche Annahme würde erklären, warum der geschlechtsspezifische Einfluß sich beim Thiopentalabbau nicht geltend macht.

Von einigen Autoren wird angenommen, daß das weibliche Keimdrüsenhormon Östradiol die Narkose bei der Ratte durch Evipan oder Pentobarbital verlängern kann (Robillard u. Mitarb. 1954; Pellerin u. Mitarb. 1954; Buchel 1954).

Auch aus den eigenen Versuchen mit Evipan könnte man zu dieser Ansicht gelangen. Geschlechtsreife Weibchen „schliefen" etwa doppelt solange wie die jungen weiblichen Tiere. (Ähnliche Beobachtungen stammen von Streicher u. Garbus 1954.) Ob das weibliche Hormon

antagonistisch zum männlichen auf das Enzymsystem in den Mikrosomen einwirkt, müßte noch näher untersucht werden.

Cook u. Mitarb. (1954) konnten die Dauer der Evipan- und Pentobarbitalnarkose bei Ratten und Mäusen durch Vorinjektion eines Diphenylpropylessigsäureesters des Diäthylaminoäthanols (SKF 525-A) um das 10—20fache verlängern. Ähnliche Verbindungen prüften Neubert u. Herken (1955) auf ihre Fähigkeit, die Evipannarkose zu verstärken. Am wirksamsten war der Phenyldiallylessigsäureester (CFT 1201). Brodie u. Mitarb. gelang der Nachweis, daß die SKF-Substanz den enzymatischen Abbau einer Reihe von Verbindungen in den Mikrosomen hemmt. (Axelrod u. Mitarb. 1954; Fouts u. Brodie 1955). Deshalb war es naheliegend anzunehmen, daß auch die von Neubert u. Herken (1955) untersuchten Verbindungen auf dem gleichen Wege ihren Effekt ausüben. Die eigenen Versuche bestätigen diese Ansicht. Sogar eine Vorinjektion in die lebende Ratte genügt, um in vitro durch Leberschnitte eine deutliche Hemmung des Evipanabbaus zu erzielen.

Wie Evipan verhalten sich Pentobarbital und weitaus die Mehrzahl der Barbiturate. Ihr Abbau wird durch die erwähnten Substanzen gehemmt. Dagegen läßt sich, wie Cook, Macko u. Fellows (1954) berichteten, die Veronal- und Thiobarbituratnarkose durch die SKF-Verbindung nicht verlängern. Ähnlich verhielt sich die CFT-Substanz in den Versuchen von Neubert u. Herken, obwohl eine geringe Verstärkung auf die Wirkung der Thiobarbiturate nicht auszuschließen war.

Aus diesen Befunden ergibt sich eine interessante Parallele zu den oben beschriebenen und zitierten Versuchen über die Wirkung der Geschlechtshormone auf den Barbituratabbau. Die Thiopentalwirkung läßt sich bei der Ratte weder durch bestimmte Substanzen verstärken noch durch die männlichen Geschlechtshormone abschwächen, während der Effekt von Evipan und Pentobarbital sowohl erhöht als auch vermindert werden kann. Die vergleichende Betrachtung verschiedener Barbitursäurederivate bestätigt die oben geäußerte Vermutung, daß die Mikrosomenenzyme der Rattenleber offenbar am Abbau des Thiopentals nicht beteiligt sind, weil sie weder unter dem fördernden Einfluß der männlichen Geschlechtshormone noch unter der hemmenden Wirkung einiger substituierter Essigsäureester stehen. Bemerkenswert ist es, daß in den Mikrosomen der *Kaninchen*leber ein Abbau von Thiopental erfolgen kann, wie von Cooper u. Brodie (1957) vor kurzem mitgeteilt wurde.

Summary

$^2/_3$ of the Evipal degraded by incubated rat liver slices are transformed in 2 unknown barbiturates. The structure of these products is discussed.

Liver slices of male albino rats destroy about 70% of the Evipal, those of females only 30—40%. Under the same conditions 10% of

Thiopental is degraded, no sex difference is noted. Correspondingly after administration of Evipal female rats "sleep" 4 times longer than males. But after injection of Thiopental the duration of anaesthesia in male and female rats is not different.

Likewise homogenate and supernatant of rabbit liver destroy Evipal with a much higher speed than Thiopental.

The in vitro degradation of Evipal can be inhibited by the injection of 50 mg./kg. i.p. of β-diethylaminoethyl-phenyldiallylacetate 1 hour before decapitation of the rats.

As discussed the biotransformation of Evipal, but not of Thiopental is delayed by this aceticacid ester and enhanced by the male sex hormone.

Literatur

Axelrod, J., J. Reichenthal and B. B. Brodie: J. Pharmacol. a. Exper. Ther. **112**, 49 (1954).

Axelrod, J.: Pharmacol. a. Exper. Ther. **114**, 430 (1955). — J. of Biol. Chem. **214**, 753 (1955b).

Brodie, B. B., L. C. Mark, E. M. Papper, P. A. Lief, E. Bernstein and E. A. Rovenstine: J. Pharmacol. a. Exper. Ther. **98**, 85 (1950).

Brodie, B. B., E. Bernstein and C. L. Mark: J. Pharmacol. a. Exper. Ther. **105**, 421 (1952).

Brodie, B. B.: Federat. Proc. **11**, 632 (1952).

Brodie, B. B., J. J. Burns, L. C. Mark, P. A. Lief, E. Bernstein and E. M. Papper: J. Pharmacol. a. Exper. Ther. **109**, 26 (1953).

Buchel, L.: Anesth. et Analg. **11**, 268 (1954).

Bush, M. T., C. T. Butler and H. L. Dickison: J. Pharmacol. a. Exper. Ther. **108**, 104 (1953).

Cook, L., E. Macko and E. J. Fellows: J. Pharmacol. a. Exper. Ther. **112**, 382 (1954).

Cooper, J. R., and B. B. Brodie: J. Pharmacol. a. Exper. Ther. **114**, 409 (1955); **120**, 75 (1957).

Cooper, J. R., J. Axelrod and B. B. Brodie: J. Pharmacol. a. Exper. Ther. **112**, 55 (1954).

Deininger, R.: Arzneimittel-Forsch. **5**, 472 (1955).

Fouts, J. R., and B. B. Brodie: J. Pharmacol. a. Exper. Ther. **115**, 68 (1955).

Holck, H. G. O., M. A. Kañan, L. M. Mills and E. L. Smith: J. Pharmacol. a. Exper. Ther. **60**, 323 (1937).

La Du, B. N., L. Gaudette, N. Trousof and B. B. Brodie: J. of Biol. Chem. **214**, 753 (1955).

Neubert, D., u. H. Herken: Arch. exper. Path. u. Pharmakol. **225**, 453 (1955).

Pellerin, J., A. D'Iorio and E. Robillard: Rev. Canad. de Biol. **13**, 257 (1954).

Quinn, G. P., J. Axelrod and B. B. Brodie: Federat. Proc. **13**, 396 (1954).

Remmer, H.: Der Anaesthesist (im Druck).

Robillard, E., A. D'Iorio and J. Pellerin: Union méd. Canada **83**, 853 (1954).

Streicher, E., and J. Garbus: J. of Gerontol. **10**, 441 (1955).

Winters, W. D., E. Spector, D. P. Wallach and F. E. Shideman: J. Pharmacol. a. Exper. Ther. **114**, 343 (1955).

Wood, H. B., and E. C. Horning: J. Amer. Chem. Soc. **75**, 5511 (1953).

Dr. H. Remmer, Pharmakologisches Institut der Freien Universität, Berlin-Dahlem, Thielallee 69/73

Arch. exper. Path. u. Pharmakol., Bd. 233, S. 184—191 (1958)

Aus dem Pharmakologischen Institut der Freien Universität Berlin

Die Verstärkung der Abbaugeschwindigkeit von Evipan durch Glykocorticoide

Von
H. Remmer

Mit 6 Textabbildungen

(Eingegangen am 22. Oktober 1957)

Nebennierenlose Tiere sind gegen Wirkungen zahlreicher Pharmaka empfindlicher als normale. Seit der Jahrhundertwende ist diese Tatsache bekannt. Brown-Sequard glaubte noch, daß in der Nebenniere giftig wirkende körpereigene und -fremde Substanzen unschädlich gemacht werden. Diese Anschauung ließ sich nie experimentell bestätigen und ist unvereinbar mit den Kenntnissen, die wir heute über die Funktion der Nebenniere besitzen. Dagegen wäre denkbar, daß Steriode aus der Rinde die Entgiftung in den Zellen, vornehmlich der Leber, verstärken. Eine ähnliche Meinung äußerten Eichholtz u. Mitarb. (1949).

Um dieses Problem zu klären, versprachen Experimente an der Ratte einen gewissen Erfolg. Sie ist die einzige Tierart, von der bisher bekannt ist, daß männliche Tiere gegen Giftwirkungen resistenter sind als weibliche (Holck u. Mitarb. 1937; Poe u. Mitarb. 1936; Winton 1927). Eigene in vitro-Versuche, in denen Evipan (Remmer) und Dolantin (Alsleben u. Remmer) zusammen mit Rattenleberschnitten bei 37° inkubiert wurden, überzeugten uns, daß die Leberzellen männlicher Ratten die beiden Substanzen doppelt so schnell oxydieren wie solche weiblicher Tiere. Zweifellos stehen die abbauenden Enzyme der männlichen Ratten unter dem fördernden Einfluß des Testosterons (Quinn, Axelrod u. Brodie 1954; Buchel 1954).

Diese Ergebnisse waren der Anlaß, noch einmal zu prüfen, ob die vermutete Entgiftungsfunktion der Nebennierenrinde vielleicht durch den Einfluß gewisser Corticosteroide auf den Abbau zustande kommt.

Methodik

Die Narkose wurde als beendigt angesehen, wenn die Ratten sich aus der Seitenlage aufrichteten und versuchten, sich fortzubewegen. Außerdem registrierten wir den Zeitpunkt, an dem es den Ratten gelang, mit den Vorderpfoten an dem oberen Rand einer Glaswand hängend, hochzuklimmen. Diese Fähigkeit erlangten die Tiere zurück, wenn die Ataxie beim Laufen sich nur noch wenig bemerkbar machte.

Cortison oder Prednisolon[1] erhielten die Ratten stets subcutan, in physiologischer NaCl-Lösung suspendiert.

Nach beiderseitiger Adrenalektomie erhielten männliche oder weibliche Ratten vom Tage nach der Operation bis zum 8. Tage täglich entweder Cortison in 0,2 ml suspendiert oder die gleiche Menge physiologische NaCl-Lösung. Zu trinken bekamen beide Gruppen physiologische Salzlösung. Am 9. Tage wurden die Tiere getötet und von den Lebern Schnitte angefertigt. Die Inkubation und Bestimmung von Evipan erfolgten genauso, wie sie bereits (Remmer) beschrieben wurden.

Ergebnis

Nebennierenlose männliche Ratten „schlafen" nach Evipan länger als die normalen Kontrolltiere. Durch Substitution mit Cortison gelingt es bei solchen Ratten, die Narkosedauer abzukürzen. Allerdings ist die Streuung der Werte sehr groß, so daß Versuche dieser Art allein nicht zuverlässige Aussagen gestatten.

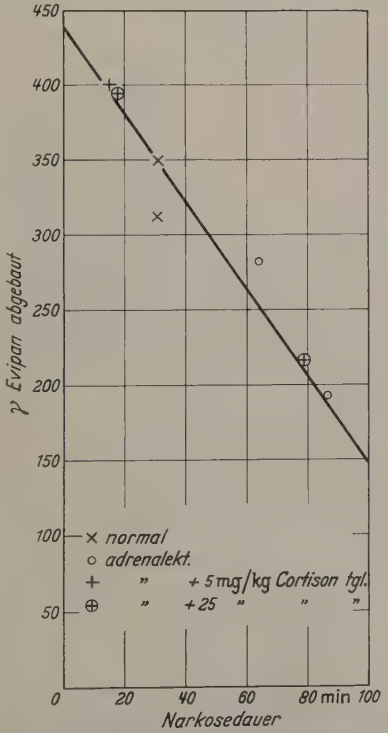


Abb. 1. Beziehung zwischen Narkosedauer und in vitro-Abbau des Evipans durch Leberschnitte normaler, adrenalektomierter und substituierter männlicher Ratten

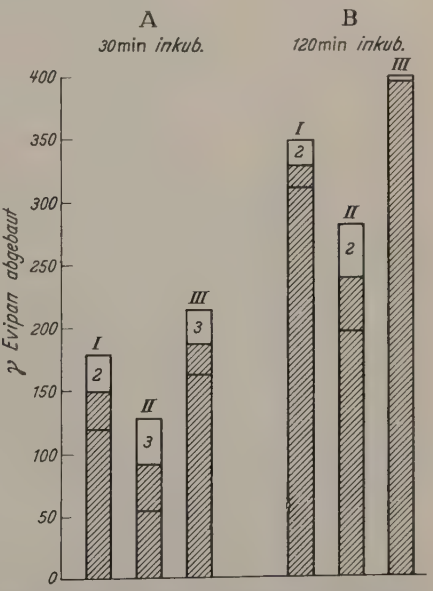


Abb. 2. *I* oper. Kontr., *II* adrenalekt., *III* adrenalekt. + 5 mg/kg/die Cortison. *Abbau* von *Evipan* durch *Leberschnitte* ♂ Ratten 7 Tage nach der Operation. Inkubation 500 γ Evipan bei 37°, O_2-Beg.

Die Bestimmung der Narkosedauer ist bei adrenalektomierten Tieren deshalb so unsicher, weil die Tiefe und Länge der Narkose nicht nur von der Geschwindigkeit des Evipanabbaues, sondern auch von anderen

[1] Herrn Dr. Iltgen von der Fa. Merck sei für die freundliche Hilfe bei der Beschaffung der Präparate gedankt.

Einflüssen, wie dem Verhalten der Körpertemperatur und des Stoffwechsels, abhängig ist. Klare Ergebnisse ließen sich nur erzielen, wenn die Entgiftungsgeschwindigkeit des Evipans in vitro geprüft wurde.

Eine Versuchsreihe sei hier trotzdem angeführt, weil sie zeigt, daß bei der gleichen männlichen Ratte die Narkosedauer der Entgiftungsfähigkeit der Leber weitgehend entspricht. Am Tage vor der Tötung wurde die „Schlafzeit" jedes einzelnen Tieres gemessen. Sie stimmte bei den verschieden behandelten Ratten auffallend gut mit der Stärke des Evipanabbaues in der Leber überein. (Abb. 1). Die Leber einer

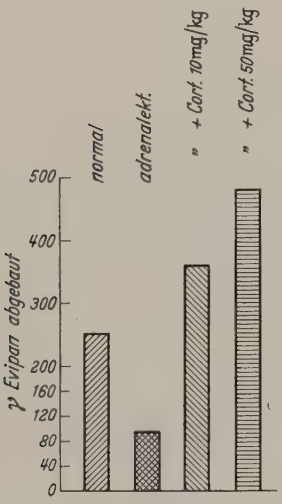


Abb. 3

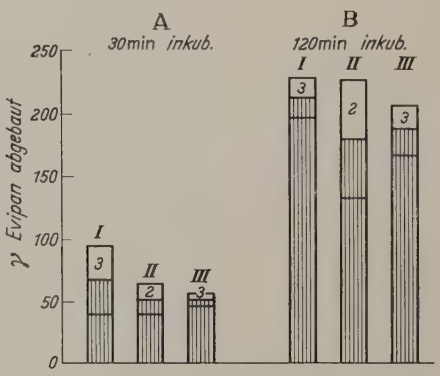


Abb. 4

Abb. 3. Evipanabbau durch Leberschnitte *männlicher* Ratten. Substitution mit Cortison 4 Tage, Tötung der Tiere am 10. Tage nach Adrenalektomie. Inkubation von Leberschnitten (40 mg Trockengewicht) mit 1 mg Evipan 1 Std lang

Abb. 4. *I* oper. Kontr., *II* adrenalekt., *III* adrenalekt. + 5 mg/kg/die Cortison. *Abbau* von *Evipan* durch *Leberschnitte* ♀ Ratten 7 Tage nach Operation. Inkubation 500 γ Evipan bei 37°. O_2-Beg.

adrenalektomierten Ratte, welche 25 mg/kg Cortison erhielt, entgiftete das Evipan wider Erwarten schlecht. Dieses Tier „schlief" aber auch dementsprechend länger.

In weiteren Versuchen an adrenalektomierten Ratten beschränkten wir uns allein auf die Bestimmung des Evipanabbaues durch Leberschnitte. Es zeigte sich, daß Leberschnitte adrenalektomierter männlicher Ratten stets weniger Evipan abbauen als solche von Kontrolltieren. Bei einem Teil dieser Vergleichsratten wurde ein ähnlicher operativer Eingriff ohne Entfernung der Nebennieren vorgenommen. Erhalten die nebennierenlosen Ratten als Substitution 5 mg/kg Cortison täglich, so ist die Fähigkeit der Leber, Evipan zu entgiften, sogar höher als bei den Kontrolltieren (Abb. 2). Da die Unterschiede zwischen normalen und substituierten Ratten gering waren, erhielten in einem weiteren Versuch mit 3 adrenalektomierten männlichen Tieren eine Ratte 10 mg/kg täglich und

Tabelle 1

Dauer der Evipannarkose nach 3tägiger Vorbehandlung männlicher und weiblicher Ratten

		Kontrolle		Cortison 6 mg/kg täglich		Hydrocortison 6 mg/kg täglich		Cortison 25 mg/kg täglich		Hydrocortison 25 mg/kg täglich	
		St.[1]	Kl.[2]	St.	Kl.	St.	Kl.	St.	Kl.	St.	Kl.
♂ 200 mg/kg i.p. Evipan	n	16		8		8		8		8	
	$\bar{M}$	**61**	**83**	**50**	**69**	**50**	**69**	**41**	**58**	**55**	**73**
	σ	± 19,5	± 31	± 9	± 12	± 13	± 16	± 10	± 14	± 12	± 16
	$\frac{\Delta}{\sqrt{\varepsilon_1^2 + \varepsilon_2^2}}$	—	—	1,9	1,6	1,6	1,5	3,2	2,7	0,9	1,0
♀ 100 mg/kg i.p. Evipan	n	12		12		12					
	$\bar{M}$	**114**	**150**	**81**	**116**	**83**	**119**				
	σ	± 18	± 18	± 22	± 29	± 12	± 20				
	$\frac{\Delta}{\sqrt{\varepsilon_1^2 + \varepsilon_2^2}}$	—	—	4,0	3,5	5,1	4,1				

[1] Narkosedauer bis zum Einsetzen der Stellreflexe.

[2] Narkosedauer bis zum Einsetzen der Klimmzugfähigkeit.

Tabelle 2. *Dauer der Evipannarkose (100 mg/kg i.p.) ♀ Ratten*

		Kontrolle		Prednisolon 1 mg/kg täglich		Prednisolon 5 mg/kg täglich		Cortison 1 mg/kg täglich		Cortison 5 mg/kg täglich		Cortison 25 mg/kg täglich	
		St.[1]	Kl.[2]	St.	Kl.	St.	Kl.	St.	Kl.	St.	Kl.	St.	Kl.
nach 3tägiger Vorbehandlung	n	16		12		12		12		12		12	
	$\bar{M}$	**116**	**159**	**59**	**82**	**65**	**81**	**82**	**115**	**83**	**107**	**66**	**97**
	σ	± 29	± 23	± 7	± 19	± 19	± 19	± 18	± 18	± 12	± 17	± 17	± 15
	s[3]	—	—	7,2	9,3	5,4	9,4	3,9	5,5	3,9	6,6	5,4	7,4
10 Tage nach Absetzen der Behandlung	n	8				12		8				12	
	$\bar{M}$	**104**	**151**			**107**	**137**	**94**	**123**			**92**	**127**
	σ	± 26	± 25			± 17	± 27	± 14	± 16			± 14	± 14
	s[3]	—	—			0,3	1,1	0,9	2,6			1,1	2,4

[1] St. siehe Anmerkung Tab. 1.

[2] Kl. siehe Anmerkung Tab. 1.

[3] $s = \frac{\bar{M}_2 - \bar{M}_1}{\sqrt{\varepsilon_1^2 + \varepsilon_2^2}}$

die andere sogar 50 mg/kg täglich Cortison, abweichend von der beschriebenen Versuchsanordnung, am 5., 6., 8. und 9. Tage nach Adrenalektomie. Am 10. Tage wurden die Ratten getötet. Die Entgiftungsfähigkeit der Leber der ersten Ratte war um 50%, die der zweiten sogar um 100% höher als diejenige der unbehandelten Kontrollratte. Beim adrenalektomierten, aber nicht behandelten Tier sank die Aktivität auf $^1/_3$ des Ausgangswertes ab (Abb. 3).

In einer ähnlichen Versuchsreihe bekamen weibliche adrenalektomierte Ratten 5 mg/kg Cortison. Unterschiede im Abbau von Evipan durch Leberschnitte waren bei dieser Dosis in den 3 Gruppen merkwürdigerweise nicht vorhanden (Abb. 4).

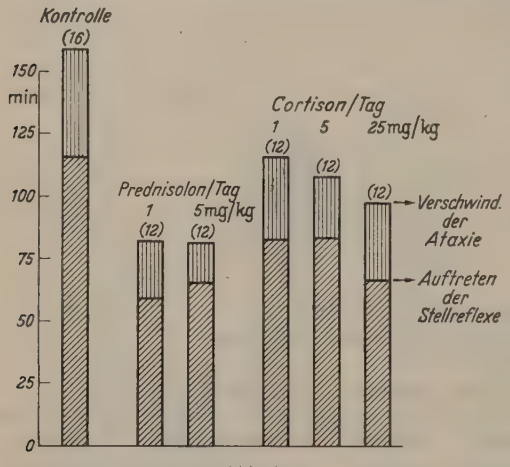


Abb. 5

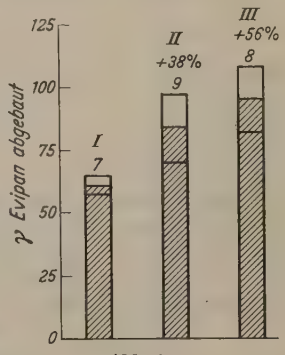


Abb. 6

Abb. 5. *Dauer* der *Narkose* ♀ Ratten nach 100 mg/kg Evipan i.p.; Vorbehandlung: 3 Tage

Abb. 6. *I* Kontrollen 0,2 ml physiol. NaCl-Lösung pro die; *II* Cortison 5 mg/kg s.c. in Susp. pro die; *III* Prednisolon 1 mg/kg s.c. in Susp. pro die. *Abbau* von *Evipan* durch *Leberschnitte* ♀ Ratten. Vorbehandlung: 4—5 Tage. Inkubation 500 γ Evipan $^1/_2$ Std

Da offensichtlich Cortison auf die Entgiftung einen Einfluß ausübte, versuchten wir, eine Verstärkung des Evipanabbaues durch Vorbehandlung *normaler* Ratten mit diesem Hormon zu erreichen. Nach 3 Tagen wurde die Narkosedauer getestet. Bei den männlichen Ratten beobachteten wir geringfügige Unterschiede, die nur schwach gesichert waren (Tab. 1). Überraschend stark war dagegen das beträchtliche Absinken der Narkosedauer, wenn weibliche Ratten Cortison, Hydrocortison oder Prednisolon erhielten (Abb. 5 und Tab. 1 u. 2). Am besten wirkte Prednisolon, bereits in Dosen von 1 mg/kg. Die „Schlafzeit" betrug nur die Hälfte des Kontrollwertes. Auch 1 mg/kg Cortison setzte bereits die Narkosedauer signifikant um 30% herab.

Vergleicht man die Zeit, die vom Auftreten der Stellreflexe bis zu dem Zeitpunkt verstreicht, an dem es den Ratten gelingt, emporzuklimmen, dann findet man, daß sie unter der Einwirkung von Cortison

und besonders stark von Prednisolon verringert wird. Dieses Verhalten weist darauf hin, daß die verkürzte „Schlafzeit" auf einer verstärkten Elimination von Evipan beruhen könnte.

1 oder 2 Tage nach dem Narkosetest wurden die gleichen Tiere getötet und der in vitro-Abbau von Evipan geprüft. Die Aktivität der Leberschnitte stieg unter der Steroidbehandlung signifikant an (Abb. 6). Vorbehandlung mit 1 mg/kg Prednisolon erhöhte die Entgiftung um 56%. Der Abbau in vitro entsprach der Narkosedauer der weiblichen Ratten am Tage vorher. 10 Tage nach Absetzen der Steroide wurde bei Tieren der gleichen Gruppe erneut die „Schlafdauer" nach Evipan getestet. Die aktivierende Wirkung der Nebennierenrinden-Hormone auf die Entgiftung war offensichtlich verschwunden. Unterschiede in der Narkosedauer waren nicht mehr festzustellen (Tab. 2).

Diskussion

Ohne Zweifel besteht eine enge Beziehung zwischen dem Glykocorticoid Cortison und der Entgiftung von Evipan. Da die bisherigen Versuche mit Ratten vorgenommen wurden, bleibt es noch unentschieden, ob das Nebennierenrinden-Hormon nur bei dieser Tierart einen solchen Einfluß ausübt. Nicht nur Evipan wird durch Cortison und Prednisolon beschleunigt entgiftet, sondern auch Dolantin, wobei die Aktivierung des Abbaues sich nur auf die Demethylierung, nicht aber auf die Hydrolyse erstreckt (Alsleben u. Remmer). Evipan wird durch Rattenleberschnitte überwiegend am Hexenylring zu Ketoverbindungen oxydiert, die narkotisch unwirksam sind. Demethylierung von Dolantin und Oxydation von Evipan sind fermentative Reaktionen, welche durch die von Brodie u. Mitarb. zuerst beschriebenen Enzyme in den Mikrosomen katalysiert werden. Daher könnte man annehmen, daß Glykocorticoide bei der Ratte in irgendeiner noch unbekannten Weise gewisse fermentative Reaktionen in den Mikrosomen der Leberzelle beschleunigen.

Denkbar wäre allerdings auch, daß die bekannte Wirkung der Glykocorticoide auf den Kohlenhydrat- und Eiweißstoffwechsel mit einem vermehrten Abbau der beiden Pharmaka zusammenhinge. Möglicherweise könnten Fermente, welche die Umwandlung glucoplastischer Aminosäuren in Glucose katalysieren und fördernd durch die Glykocorticoide beeinflußt werden, auch die Oxydation von Evipan und die Demethylierung von Dolantin bewirken. Für diese Annahme gibt es aber keine Beweise. Enzyme, welche Aminosäuren desaminieren, sind spezifisch auf diese Substrate eingestellt. Ebenso katalysieren die dealkylierenden und desaminierenden Fermente in den Mikrosomen weder den Abbau von Aminen, welche im Stoffwechsel entstehen, noch die Desaminierung von Adrenalin. Außerdem unterscheiden sie sich dadurch von Fermenten, die in den Aminosäurestoffwechsel eingreifen, daß sie reduziertes TPN als Coferment benötigen (Axelrod 1955, 1956; La Du, Brodie et al. 1955).

Wenn man also mit ziemlicher Sicherheit annhmen kann, daß der Abbau der genannten Pharmaka nichts mit den normalen enzymatischen

Vorgängen des Stoffwechsels zu tun hat, dann ist auch die Vermutung berechtigt, daß jede Förderung des Abbaues von Evipan und Dolantin durch Glykocorticoide auf einer noch unbekannten Wirkung dieser Hormone auf die enzymatischen Prozesse, die dabei ablaufen, beruht.

In der Einleitung wurde bereits darauf hingewiesen, daß Leberschnitte männlicher Ratten Evipan und Dolantin doppelt so schnell abbauen wie diejenigen weiblicher Tiere (Remmer; Alsleben u. Remmer). Ähnlich verhalten sich die Mikrosomen enthaltenden Zellplasmafraktionen von männlichen und weiblichen Ratten (Quinn, Axelrod u. Brodie 1954; Axelrod 1956; Alsleben u. Remmer).

Quinn u. Mitarb. gelang es, einen stärkeren Evipanabbau durch die in den Mikrosomen vorhandenen Enzyme zu erreichen, wenn sie 6 Wochen lang weiblichen Ratten täglich Testosteron applizierten. Buchel (1954) benötigte 2 Wochen, um bei täglicher Injektion von 2 mg/kg Testosteron die Dauer der Evipannarkose zu verkürzen.

Nur 3 Tage Vorbehandlung mit relativ geringen Dosen von Cortison und Prednisolon genügten, um in den beschriebenen Versuchen den Evipanabbau durch Leberschnitte weiblicher Ratten um 50% zu erhöhen und dadurch die Dauer der Evipannarkose auf die Hälfte herabzusetzen. Es scheint, als ob die entgiftende Wirkung der beiden Steroidhormone Testosteron und Cortison bei der Ratte eng miteinander verknüpft wäre. Bei männlichen Ratten läßt sich anscheinend durch Cortisongaben das abbauende System nur sehr schwer aktivieren, da es bereits durch den Testosteroneinfluß erheblich in seiner Wirkung verstärkt ist. Anders läßt sich kaum die Tatsache verstehen, daß auch 25 mg/kg Cortison bei männlichen Ratten nur eine geringe Verkürzung der Evipannarkose bewirken.

In Versuchen von Robillard u. Mitarb. (1954) mit männlichen normalen Ratten, die eine noch höhere Dosis erhielten, 3 Tage lang 50 mg/kg, fiel die Dauer der Pentobarbitalnarkose allerdings fast auf die Hälfte ab. Die genannten Autoren fanden in ihren Untersuchungen, daß die Narkosedauer sowohl nach Kastration als auch nach Adrenalektomie in gleicher Weise zunimmt. Genauso lange dauert die Narkose, wenn den Tieren die Nebennieren *und* die Hoden fehlen; durch Cortisonbehandlung (3 Tage 50 mg/kg) läßt sich die Narkosedauer auf den normalen Wert wieder verkürzen, nicht aber durch Vorbehandlung mit Testosteron.

Testosteron scheint nur dann auf die Entgiftung wirksam zu sein, wenn die Ratten Nebennieren besitzen. Vielleicht muß aus Testosteron erst eine wirksame, den Rindensteroiden verwandte Substanz entstehen. Dafür spräche auch die Tatsache, daß Glykocorticoide bei normalen Weibchen bereits nach wenigen Injektionen wirksam sind, während Testosteron erst nach mehrwöchiger Vorbehandlung die Narkosedauer herabsetzt.

Während bei nebennierenlosen männlichen Ratten der Evipanabbau durch Behandlung mit Cortison sich verstärken läßt, ist das mit der gleichen Dosis bei weiblichen Tieren nicht möglich. Die Ursache dafür ist noch unklar.

Die Versuche beweisen, daß bei der Ratte Glykocorticoide die Entgiftung von bestimmten Pharmaka beschleunigen können. Möglicherweise steht dieser Effekt in einem engen Zusammenhang mit der stärkeren Resistenz der männlichen Ratte gegen gewisse Giftwirkungen.

Summary

After administration of 1 mg./kg. Cortison or Prednisolon daily for 3 days, the duration of Evipal anaesthesia in female albino rats decreases about 30 to 50%. Correspondingly the degradation of Evipal by liver slices of the same rats increases about 38 to 56%.

After adrenalectomy the destruction of Evipal by liver slices of male rats is reduced. If this group of rats has been treated with Cortison, the liver slices transform more Evipal than those of normal rats of the control group.

The enhancing effect of glycocorticoids on the oxidation of Evipal is discussed in relation with the higher resistance of male rats against the action of some drugs.

Literatur

Alsleben, B., u. H. Remmer: unveröffentlichte Versuche.

Axelrod, J.: J. of Biol. Chem. **214**, 753 (1955). — J. Pharmacol. a. Exper. Ther. **117**, 322 (1956).

Buchel, L.: Anesth. et Analg. **11**, 268 (1954).

Eichholtz, F., R. Hotovy, P. Collischonn u. H. Knauer: Arch. exper. Path. u. Pharmakol. **207**, 576 (1949).

Holck, H. G. O., M. A. Kanăn, L. M. Mills and E. L. Smith: J. Pharmacol. a. Exper. Ther. **60**, 323 (1957).

La Du, B. N., L. Gaudette, N. Trousof and B. B. Brodie: J. of Biol. Chem. **214**, 741 (1955).

Poe, Ch. F., J. F. Suchy and N. F. Witt: J. Pharmacol. a. Exper. Ther. **58**, 239 (1936).

Quinn, G. P., J. Axelrod and B. B. Brodie: Federat. Proc. **13**, 396 (1954).

Remmer, H.: Arch. exper. Path. u. Pharmakol. **233**, 173 (1958).

Robillard, E., A. D'Jorio and J. Pellerin: Union méd. Canada **83**, 853 (1954).

Winton, F. R.: J. Pharmacol. a. Exper. Ther. **31**, 123 (1927).

Dr. H. Remmer, Pharmakologisches Institut der Freien Universität, Berlin-Dahlem, Thielallee 69/73

Arch. exper. Path. u. Pharmakol., Bd. 233, S. 192—200 (1958)

Aus dem Pharmakologischen Institut der Freien Universität Berlin

Der Gehalt des Herzmuskels an Adenosintriphosphorsäure bei experimentellen Ödemen

Von
H. Coper, H. Herken und G. Senft

Mit 3 Textabbildungen

(Eingegangen am 31. Oktober 1957)

Bei Untersuchungen über die Pathogenese experimenteller Ödeme, die an Ratten durch orale Dauerinfusion physiologischer Salzlösungen erzeugt wurden, fanden sich altersbedingte Störungen des Mineralstoffwechsels und Wasserhaushaltes, deren Ursache in Abweichungen der Tätigkeit von Nebennierenrinde und Hypophysenhinterlappen bzw. des Hypothalamus gesucht werden mußte (Herken, Senft u. Schaper 1957). Die Analyse der Wasser- und Salzbilanz ließ erkennen, daß die Ödembildung stets mit einer Natriumretention begann. Die primäre Störung im Mineralstoffwechsel wurde als Zeichen einer gesteigerten Aktivität des salzretinierenden Hormones der Nebenniere angesehen, die gesamte Funktionsstörung daher als *Halocortintyp* des Ödems bezeichnet. Die festgestellten Veränderungen entsprachen im Prinzip den Symptomen, die für die meisten menschlichen Ödemkrankheiten charakteristisch sind.

Aus diesem Grunde schienen diese experimentellen Störungen zur Erforschung von Stoffwechselveränderungen in den Zellen besonders geeignet, die als Folge der Anhäufung von Wasser im extracellulären Raum auftreten können. Obwohl über diese Frage viel diskutiert wurde, ist darüber sehr wenig bekannt, weil die *intracellulären* Vorgänge durch den Mangel einer geeigneten Versuchsanordnung bisher kaum erfaßt werden konnten, wenn man von indirekt ermittelten Abweichungen absieht.

In dieser Arbeit interessierte uns besonders das Verhalten der höher phosphorylierten Adeninnucleotide des Herzens, deren Bedeutung für die Funktion der Muskelfibrillen vielfach untersucht, aber immer noch nicht vollständig geklärt werden konnte.

Wie in früheren Arbeiten (Herken, Senft u. Wilutzky 1956 u. 1957; Herken, Senft u. Schaper 1957), wählten wir für diese Versuche Tiere verschiedenen Alters aus, wobei wir uns auf die zwei Gewichtsgruppen A

(200—250 g) und C (300—350 g) beschränkten, zwischen denen die stärksten Abweichungen im Mineralstoffwechsel und Wasserhaushalt beobachtet wurden.

Zur Bestimmung der freien Nucleotide wurden die ausgebluteten, aber noch schlagenden Herzen der Ratten im Mörser bei 0° zerkleinert und mit 5%iger Trichloressigsäure extrahiert. Die Trennung der einzelnen Verbindungen geschah papierchromatographisch nach den Angaben von L. V. Eggleston u. R. Hems (1952). Als Lösungsmittel dienten Propanol, Ammoniak, Wasser im Verhältnis von 60:30:10. Nach 2maliger absteigender Chromatographie von 16 Std Dauer wurden die deutlich getrennten Fraktionen mit n/100 Salzsäure aus dem Papier eluiert und die Extinktion dieser Eluate im Beckman-Spektralphotometer Modell DU bei 260 mμ gemessen. In den gleichen Eluaten wurde die Ribose mit Orcin nach W. Meijbaum (1939), modifiziert nach C. P. Barnum (1953) und der Phosphatgehalt nach J. Berenblum u. E. Chain (1938) bestimmt. Die Identifizierung der nach Hydrolyse gewonnenen freien Basen erfolgte durch Aufnahme der UV-Spektren im sauren und alkalischen Milieu.

Die Auswertung der Chromatogramme ergab, daß die Adeninnucleotide im Herzmuskel so stark überwiegen, daß die übrigen Nucleotide vernachlässigt werden können. Bei der Analyse der einzelnen adeninhaltigen Fraktionen wurde jedoch festgestellt, daß mit dem Adenosinmonophosphat auch andere anorganische und organische Phosphatverbindungen wandern, die keine Absorption im UV-Licht erkennen ließen. Ihre genaue Identifizierung ist für unsere Untersuchungen von untergeordneter Bedeutung. Bei der Aufarbeitung der ATP- und ADP-Fraktionen stimmten die molaren Konzentrationen von Base (= 1), Ribose und Phosphat in 16 Versuchen mit den theoretischen Werten genügend überein, so daß beide als einheitlich angesehen werden können.

Tabelle 1

	Base	Ribose	Phosphat
Adenosinmonophosphat	= 1	: 1,00	: 1,64
Adenosindiphosphat	= 1	: 1,08	: 1,93
Adenosintriphosphat	= 1	: 1,11	: 2,85

Die aus dem Herzmuskel isolierten Nucleotidfraktionen zeigen beim Vergleich der beiden Altersklassen einen auffälligen, bisher nicht bekannten Konzentrationsunterschied, der sich in der einwandfreien Verminderung von Adenosintriphosphorsäure bei den Tieren der Gruppe C ausdrückt (Abb. 1).

Obwohl zahlreiche Untersuchungen über die möglichen Zusammenhänge zwischen dem Gehalt und dem Stoffwechsel der energiereichen Adenosintriphosphorsäure und über ihre Bedeutung für die Herzmuskelfunktion vorliegen, die auch zur Deutung der Wirkungen von Herzglykosiden herangezogen wurden, konnte bisher keine befriedigende Erklärung erreicht werden. A. Wollenberger (1949) hat sich mit diesen Fragen sehr eingehend auseinandergesetzt und darauf hingewiesen, daß die zu einem bestimmten Zeitpunkt gefundene ATP-Konzentration höchstens

gewisse Aussagen über den Zustand des Gleichgewichtes zwischen Synthese und Abbau ermöglicht, aber keine Rückschlüsse auf die Funktionsstörungen zuläßt, weil für deren Beurteilung ganz überwiegend die Feststellung der Geschwindigkeit des Phosphatumsatzes innerhalb der einzelnen Nucleotidfraktionen notwendig ist. Auf Grund seiner eigenen Untersuchungen über die Wirkung der Herzglykoside vertrat A. Wollenberger (1949) die Ansicht, daß etwa auftretende Abweichungen vom Normalzustand auf einer erhöhten oder verminderten Energiebereitstellung oder einer Änderung in der Verwertung chemisch gespeicherter Energie beruhen können, deren Auswirkung auf die mechanische Arbeitsleistung des Herzens grundverschieden sein muß. Seine eingehenden Beobachtungen hat er so zusammengefaßt, daß eine Abnahme von ATP im allgemeinen auf vermehrten Umsatz des energiereichen Phosphates hindeutet, während die Zunahme für eine Verlangsamung des gleichen Stoffwechsels sprechen soll. Natürlich können dabei auch noch Störungen der Synthese eine Rolle spielen, die zu einer mangelnden Energiebereitstellung führen müssen. Es ist nicht ausgeschlossen, daß gerade die zuletzt genannte Veränderung für die Abnahme der ATP-Konzentration des Altersherzens verantwortlich ist. So fanden O. Kleifeld u. Mitarb. (1956), daß im Linsenextrakt von alten Kaninchen und Rindern weniger ATP gefunden wird. Mit unseren eigenen Beobachtungen stimmte gut überein, daß im Skeletmuskel $2^1/_2$—3jähriger Ratten wesentlich niedrigere ATP-Konzentrationen gefunden wurden als bei 1jährigen (F. Boulière u. Mitarb. 1954). Es wird aber außerdem zu prüfen sein, ob nicht der gesamte Umsatz der Nucleotide verlangsamt ist, so daß weniger Riboside für die Phosphorylierung zur Verfügung stehen. Auch die Tätigkeit von einigen Fermenten, z. B. der Hexokinase scheint durch das Alter betroffen werden zu können, während andere, z. B. die glykolytischen Enzyme, unverändert bleiben. Eine altersbedingte Konzentrationsänderung wurde auch für die Succinoxydase in der Niere beschrieben (Ch. Barrows u. Mitarb. 1957).

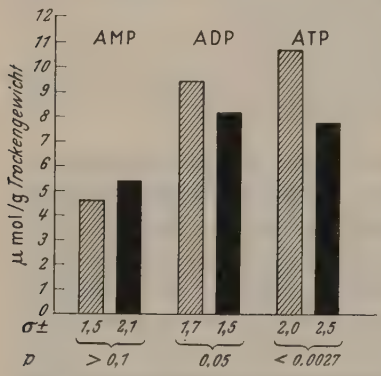


Abb. 1. Die Adeninnucleotide im Herzmuskel junger und alter Ratten. ▨ Gruppe A (etwa 250 Tage alt): 15 Tiere. ■ Gruppe C (über 400 Tage alt): 15 Tiere

Da sich die oben aufgeworfene Frage im wesentlichen mit der Klärung von Folgeerscheinungen befassen soll, die sich aus den experimentellen Störungen des Mineralstoffwechsels und Wasserhaushaltes für die freien Adeninnucleotide des Herzmuskels ergeben, war eine endgültige Deutung der gefundenen Altersveränderungen zunächst nicht erforderlich. Die beobachteten Abweichungen schienen sich aber wegen der großen Unterschiede zwischen beiden Versuchstiergruppen als Ausgangspunkt für die weiteren Untersuchungen besonders zu eignen.

Wie in den früheren Versuchen wurden die Störungen im Mineralstoffwechsel und Wasserhaushalt der Versuchstiere durch 24stündige Infusion einer physiologischen Kochsalzlösung in den Magen von Ratten verschiedenen Alters ausgelöst (Herken, Senft u. Wilutzky 1956).

Durch Stuhluntersuchungen konnte festgestellt werden, daß Kochsalz und Wasser bei kontinuierlicher Infusion von 2 ml in der Stunde quantitativ resorbiert werden. Unter diesen Bedingungen entstehen nur bei den älteren Tieren Ödeme, wie sich aus den Natrium- und Wasserbilanzen erkennen läßt. Die Aufarbeitung des Herzmuskels zur Bestimmung der Nucleotidkonzentration erfolgte in beiden Tiergruppen am Ende des 24stündigen Versuches und führte zu folgendem Ergebnis.

Tabelle 2

	Gruppe A		Gruppe C	
	Wasser- und Natriumausscheidung im Harn von Ratten nach einer 24stündigen oralen Infusion mit physiologischer Salzlösung			
	Fl/ml	Na/μval	Fl/ml	Na/μval
Einfuhr	30,0*	6392**	30,1*	6392**
Harnausscheidung	37,7	5770	10,0	1340
$\sigma \pm$	4,5	605	2,8	349
Retention		622	20,1	5052
Retention in Prozent der Einfuhr		9,7	66,7	79,0
Anzahl der Versuche	28		23	

	Adeninnucleotidgehalt der Herzen vor und nach der Infusion			
	Nucleotidgehalt μmol/g Trockengewicht		Nucleotidgehalt μmol/g Trockengewicht	
	vor Dauerinfusion	nach Dauerinfusion	vor Dauerinfusion	nach Dauerinfusion
AMP	4,6	4,8	5,4	3,7
$\sigma \pm$	1,5	1,7	2,1	2,0
p			0,07	
ADP	9,4	8,8	8,2	9,0
$\sigma \pm$	1,7	1,2	1,5	1,9
ATP	10,7	9,9	7,8	10,8
$\sigma \pm$	2,0	1,8	2,5	2,2
p			0,007	
Anzahl der Versuche	15	13	15	8

* Nach Abzug der extrarenalen Flüssigkeitsverluste.
** Nach Abzug der extrarenalen Na-Verluste.

Die Tiere der Gruppe A, die nach der 24stündigen Infusion Wasser und Natrium quantitativ ausschieden, ließen keine Unterschiede im Gehalt des Herzmuskels an Adeninnucleotiden gegenüber den nicht durchströmten erkennen. In den Herzen der Tiere aus Gruppe C, die nach der

Retention von Wasser und Natrium auch äußerlich erkennbare Ödeme an Kopf und Pfoten aufwiesen, wurde dagegen erheblich mehr Adenosintriphosphorsäure gefunden als in der entsprechenden Kontrollgruppe, die dieser Belastung nicht ausgesetzt war.

Diese Ergebnisse stellten uns vor die Frage, ob die gefundene Abweichung im Nucleotidgehalt des Herzmuskels alter Tiere lediglich als Folge der altersbedingten Störung im Hormonhaushalt anzusehen ist oder nur durch die Veränderungen des Zellstoffwechsels verursacht wird, die mit der Ausbildung eines Ödems generell verbunden sind. Wir haben dies auf folgende Weise zu klären versucht. Neben dem Ödem vom Halocortintyp, das sich durch ein Überwiegen der Natriumretention gegenüber der Wasserspeicherung auszeichnet, haben wir bei adrenalektomierten Tieren unter sonst gleichen Infusionsbedingungen ein anderes Ödem erhalten, das sich von dem ersten durch die primäre Wasserretention unterscheidet. Als Folge der Adrenalektomie entstehen besonders in den ersten Stunden des Versuches starke Natriumverluste, deren Intensität erst im späteren Verlauf nachläßt. Die Auswertung der Bilanzen führte zur Aufstellung eines Na/Fl-Retentionsquotienten, der die verschiedene Genese beider Ödemtypen besonders deutlich macht.

Tabelle 3. *Natrium- und Flüssigkeitsretentionsquotienten während der 1.—6. und 7.—24. Std einer oralen Dauerinfusion mit isotonischer Salzlösung*

	Halocortinödem		Adiuretinödem	
	1.—6. Std	7.—24. Std	1.—6. Std	7.—24. Std
Na/Fl Retentionsquotient	1,28	1,12	0,88	1,02
n	16	16	12	12

Da der ermittelte Quotient bei den nebennierenlosen Versuchstieren ungefähr = 1, meist sogar noch etwas kleiner war, haben wir diese Störung des Stoffwechsels als *Adiuretintyp* des Ödems bezeichnet. Diese Deutung schien uns auch deswegen berechtigt, weil sich der gleiche Effekt an geeigneten adrenalektomierten Versuchstieren der Gruppe C, bei denen ein Ausfall der endogenen Vasopressin-Synthese angenommen werden konnte, mit reinem synthetischem Vasopressin wiederherstellen ließ (Herken, Senft u. Schaper 1957).

In der folgenden Versuchsreihe prüften wir zunächst das Verhalten der Adeninnucleotide des Herzmuskels bei nebennierenlosen Tieren der Gruppe A und C vor und nach der Dauerinfusion, die 4 Tage nach der Exstirpation der Nebennieren vorgenommen wurde. Dabei ergab sich, daß die ATP-Konzentration des Herzens durch die Adrenalektomie allein nicht beeinflußt wird. Sie änderte sich aber, wenn die Tiere nach 24stündiger Infusion der physiologischen Lösung Wasser und Kochsalz

retinierten. Auch hier kommt es zu einer Anhäufung von Adenosintriphosphorsäure, wobei der erzielte Effekt unter den gleichen Versuchsbedingungen bei den alten Tieren eindeutig stärker ist (Abb. 2).

Es finden sich aber noch weitere Unterschiede, die dafür sprechen, daß der Stoffwechsel der Adeninnucleotide bei den experimentellen Ödemen in beiden Versuchsserien nicht gleichmäßig abläuft. Obwohl die beobachteten Abweichungen in der Gruppe A statistisch nicht so gut gesichert sind wie in der Gruppe C, läßt sich folgendes feststellen: Die

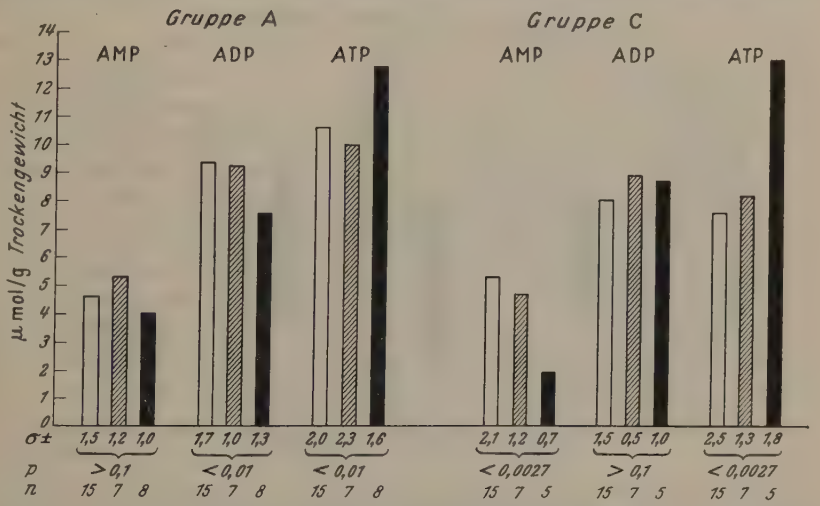


Abb. 2. Die Adeninnucleotide im Herzmuskel adrenalektomierter Ratten vor und nach Dauerinfusion. □ Kontrolltiere vor Dauerinfusion; ▨ 4 Tage nach Adrenalektomie vor Dauerinfusion; ■ 4 Tage nach Adrenalektomie nach Dauerinfusion

Erhöhung der *ATP-Konzentration* ist bei den jüngeren Tieren von einer annähernd äquivalenten *Verminderung* der Adenosin*diphosphat*konzentration begleitet. Die Menge des Adenosinmonophosphates verändert sich nicht. Bei der Versuchstiergruppe C erfolgt dagegen die *Vermehrung des ATP* ganz überwiegend auf Kosten des *Adenosinmonophosphates*, wobei keine Veränderung im Bereich des Diphosphates zu registrieren ist. Diese Ergebnisse schließen auch ohne Verwendung von radioaktivem Phosphat mit ziemlicher Sicherheit aus, daß die durch das Ödem erzeugte Stoffwechselstörung nur auf einer Verlangsamung der enzymatischen Phosphatabspaltung in den Nucleotiden beruht. Über weitere Einzelheiten dieser Funktionsstörung können wir erst nach Abschluß der Versuche mit radioaktivem Phosphat berichten. Die Gesamtmenge der Adeninnucleotide bleibt in allen Versuchsreihen weitgehend konstant, so daß zusätzliche Neubildungen unter der Einwirkung des Ödems unwahrscheinlich sind.

Obwohl die ATP-Konzentration des Herzmuskels bei den adrenalektomierten Versuchstieren nach Erzeugung des Adiuretinödems höher ist als bei den gleichaltrigen Versuchstieren mit Halocortinödemen, läßt das Verhalten des Adenosinmonophosphates erkennen, daß keine prinzipiellen Unterschiede in der Stoffwechselstörung bei Ausfall oder Mitwirkung der Nebennierenrindenhormone bestehen.

Weitere Untersuchungen über die Abhängigkeit der gefundenen Veränderung von der Menge des retinierten Wassers ergaben nun, daß die

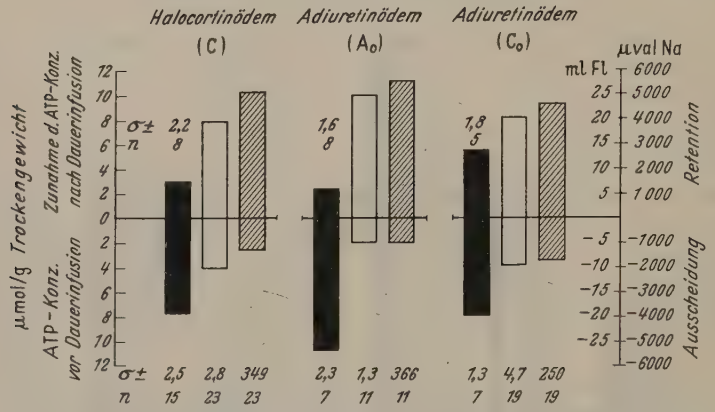


Abb. 3. Flüssigkeits- und Natriumretention sowie ATP-Zunahme nach Dauerinfusion. ■ ATP; □ Flüssigkeit; ▨ Natrium

Intensität des Ödems allein auch nicht für die verschiedenartigen Folgen auf den Stoffwechsel der Herzmuskelzelle verantwortlich gemacht werden kann (Abb. 3).

Dies läßt sich besonders gut aus dem Vergleich der erzielten Veränderungen bei den adrenalektomierten Versuchstieren der Gruppe A und C erkennen. Die stärkere Wasserretention führt bei den jüngeren Tieren nur zu einer verhältnismäßig geringfügigen Steigerung der ATP-Konzentration, so daß in der Versuchsgruppe A_0 für 10 ml retinierten Wassers nur 0,9 µmol ATP mehr gefunden werden. Bei der Gruppe C_0 sind es dagegen 2,6 µmol ATP/10 ml Wasser. Die geringere Wasserretention bei den adrenalektomierten Tieren der Versuchsreihe C_0 beruht, wie wir früher zeigen konnten, mit großer Wahrscheinlichkeit auf einem altersbedingten Nachlassen der Vasopressin-Synthese im Zwischenhirn. Aus Versuchen mit synthetischem Hormon läßt sich berechnen, daß in dieser Versuchsreihe etwa 150 mE Vasopressin weniger synthetisiert wurden als von den adrenalektomierten Versuchstieren der Gruppe A_0. Auf ein gleiches Körpergewicht bezogen entspricht dies einer Herabsetzung der biochemischen Leistung des Zwischenhirnes um annähernd 25%. Es ist jedoch nicht sicher, ob dieser Ausfall der Vasopressinproduktion

für den Anstieg der ATP-Konzentration beim Adiuretinödem der alten Versuchstiere verantwortlich gemacht werden kann. Dagegen läßt sich zeigen, daß keine Beziehungen zwischen dem Ausmaß der Natriumretention und der Änderung der ATP-Konzentration in den Herzmuskelzellen bestehen. Allerdings wird in Untersuchungen mit radioaktivem Natrium noch zu klären sein, unter welchen Bedingungen eine Abwanderung von Natriumionen in die Zellen stattfindet, die nach früheren Berechnungen bei der Ausbildung des Halocortinödems eintreten muß.

Nach diesen Feststellungen scheinen die wesentlichen Unterschiede im Verhalten der Adeninnucleotide von jungen und alten Tieren, die zweifellos durch das Ödem verstärkt und dadurch leichter erfaßbar werden, auf altersbedingten Veränderungen im Stoffwechsel der Herzmuskelzelle selbst zu beruhen, deren Ursachen noch unbekannt sind. Die festgestellte Verminderung des Adenosintriphosphates bei den alten Tieren hat offensichtlich keine Bedeutung für die Genese der nach Dauerinfusion auftretenden Ödeme, wie die Prüfung der Leistungsfähigkeit der Herzen in vivo und in vitro durch Jaeckel (1958) ergab, so daß es sich auch nicht um die Folgen einer Mehrbelastung des Kreislaufes handeln kann. Die angewandte Methode dient nicht nur der Erweiterung unserer Kenntnisse über den Ablauf wichtiger Stoffwechselprozesse des Herzmuskels, die sich im Verlauf von Störungen des Mineralstoffwechsels und Wasserhaushaltes einstellen, sondern bietet auch neue Möglichkeiten zur Bearbeitung therapeutischer Fragen.

Summary

Constant oral infusion of isotonic saline solution into old rats causes edema, the effect of which is studied as to the adeninenucleotides of the heart muscle.

It was demonstrated that the heart muscle of older animals (group C) before the development of edema contains less ATP than that of younger rats (group A).

There is no change of adeninenucleotides after the infusion in the heart of animals of group A excreting water and sodium quantitatively during the 24 hours' experiment.

Concerning the animals of group C there is more ATP in the heart of those which retard water and sodium that can be realized by edema of the head and paws.

There are remarkable differences of adeninenucleotide concentration in the heart muscle of young and old animals with experimentally caused edema of different kinds, that is before adrenalectomy (halocortin type) and after it (adiuretin type). The increase of the ATP-concentration in younger animals is related to an almost equivalent decrease of ADP. The AMP-concentration is not changed. In older

animals the increase of ATP is correlated with a decrease of AMP, whereas ADP does not change.

The results indicate that the increase of ATP caused by edema is not to be referred only to a diminished rate of the nucleotide metabolism.

The intensity of the observed impairment of the metabolism in the heart muscle is not only caused by the amount of retarded water. The adrenalcortical hormones have apparently no significance in this respect. The biological meaning of vasopressin has to be investigated further.

The change of nucleotides in the heart muscle of older animals which is accentuated after the development of edema depends most likely on an aging caused impairment of the cell metabolism which cannot be explained so far.

Literatur

Barnum, C. P., C. W. Nash, E. Jennings, O. Nygaard and H. Vermund: Arch. of Biochem. a. Biophysics **25**, 376 (1952).

Barrows, Ch., M. J. Yiengst, N. W. Shock and B. F. Chow: Federat. Proc. **16**, I. 6 (1957).

Berenblum, J., and E. Chain: Biochemic. J. **32**, 295 (1938).

Boulière, F.: Schweiz. med. Wschr. **1954**, 1310.

Dreyfus, J. C., G. Schapira and F. Boulière: C. r. Soc. Biol. (Paris) **1954**, 1065.

Eggleston, L. V., and R. Hems: Biochemic J. **52**, 156 (1952).

Herken, H., G. Senft u. H. Wilutzky: Arch. exper. Path. u. Pharmakol. **229**, 123 (1956); **230**, 524 (1957). — Klin. Wschr. **1956**, 781.

Herken, H., G. Senft u. J. Schaper: Arch. exper. Path. u. Pharmakol. **230**, 284 (1957).

Jaeckel, K.: unveröffentlichte Versuche.

Kleifeld, O., N. Ayberk and O. Hockwin: v. Graefes Arch. f. Ophthalm. **158**, 34 (1956).

Meijbaum, W.: Z. physiol. Chem. **258**, 117 (1939).

Wollenberger, A.: Pharmacol. Rev. **1**, 311 (1949).

Prof. Dr. H. Herken, Pharmakologisches Institut der Freien Universität, Berlin-Dahlem, Thielallee 69/73

Arch. exper. Path. u. Pharmakol., Bd. 233, S. 201—225 (1958)

Aus dem Anatomischen Laboratorium der Universitäts-Hautklinik Köln
(Direktor: Prof. Dr. med. J. Vonkennel)

Über die Wirkung eines standardisierten Thymusextraktes auf die Häutungsvorgänge und auf einige Organe von Natrix natrix L.

Von
Hans Günter Goslar *

Mit 7 Textabbildungen

(Eingegangen am 10. August 1957)

Einleitung

In einer Reihe neuerer Arbeiten ist einer endokrinen Funktion des Thymus wieder besondere Beachtung geschenkt worden (Comsa 1949, 1952, 1955, 1956, Harms 1949, 1952, Klein 1956)[1], nachdem schon Jahre vorher die Meinungen hierüber hin- und hergegangen waren. „Selbst dies ist noch Gegenstand wissenschaftlichen Streites, ob der Thymus *überhaupt* als innersekretorische Drüse anzusehen ist oder, wie Kingsbury und Hammar meinen, nicht zu ihnen gehört" (v. Buddenbrock 1950, S. 203, vgl. auch entsprechende Ausführungen bei Tesseraux 1953). Schwierigkeiten der genauen Abgrenzung seiner Funktion liegen nach Comsa einmal in der Methodik der Exstirpation des Organs und der nachfolgenden Beobachtung der auftretenden Ausfallserscheinungen, zum anderen aber besonders in der Gewinnung genau definierbarer Wirkstoffe zus Austestung und zur Substitution.

Mit verschieden hergestellten Extrakten (wäßrigen, acetonlöslichen u. a.) erzielte man folgende Wirkungen:

1. antithyreoidale,
2. blutdrucksenkende (Milz- und Lymphknotenextrakte sollen diese Wirkung nicht zeigen) (siehe Comsa 1950, Klein 1956, Knödgen 1952—1953, vgl. aber schon Knipping u. Rieder 1924),
3. Hemmung der Depolarisation an den motorischen Endplatten (Wilson u. Wilson 1955, vgl. dazu auch Szent-Györgyi 1957).

Comsa vermutet nun eine Mehrzahl spezifisch aktiver Substanzen in dem Thymus; die gefundenen Wirkstoffe sollen nur in wäßrigen Extrakten vorhanden

* Mit technischer Assistenz von Frau I. Gordon-Kreimeyer.

[1] *Anmerkung bei der Korrektur.* Auch die Wirkung auf Wachstum und Formbildung ist in neueren Arbeiten mit fraktionierten Extrakten wieder untersucht worden. [K. J. Nobis, Z. wiss. Zool. **159**, 1 (1956); L. Schneider, Arch. Entw. mechan. **149**, 644 (1957)]. Über den Thymus „als Indikator für die endokrin gesteuerte Stoffwechsellage des wachsenden Organismus" s. H. Karg, Vitam. u. Horm. **7**, 393 (1957).

sein; Extrakte gleicher Herstellung von anderen lymphatischen Organen (Milz) zeigen keine dieser beschriebenen Wirkungen.

Bei dem Häutungsgeschehen der Reptilien spielt nach bisherigen Untersuchungen die Schilddrüse eine wesentliche Rolle. Eggert (1933 bis 1936) beschrieb eine cyclische Veränderung derselben während des Häutungsablaufes bei Lacerta; nach Halberkann bewirken hohe Thyroxingaben sowie Zufuhr von thyreotropem Hormon eine Hemmung des Häutungscyclus bei Natrix, während nach Thyreostatica eine Beschleunigung eintritt (1953, 1954). Dabei scheinen die Ergebnisse stark vom Zeitpunkt der Erstapplikation im Rahmen des Häutungscyclus abhängig zu sein, wie man aus den Halberkannschen Arbeiten entnehmen kann; nur so lassen sich die widerspruchsvollen Befunde erklären. Es erscheint weiterhin schwer deutbar, daß die nach Thyroxin auftretende allgemeine Stoffwechselsteigerung nicht gerade zu einer Häutungs-*Beschleunigung* führt. Dem von verschiedenen Autoren beobachteten Ausfall der Häutungsphase nach Exstirpation der Schilddrüse bei erwachsenen Tieren (Amphibien und Reptilien) (Adams u. Richards 1929, Adams, Richards u. Kuder 1930, Adams, Kuder u. Richards 1932, Drzewicki 1924, 1928, Eggert 1933) stehen gegenteilige Beobachtungen, also Häufung der Häutungsphasen, gegenüber (Schaefer 1933, Krockert 1941). Setzt man die bei den Vögeln bekannte Mauser in Analogie zur Häutung, so wird auch hier durch Hemmung der Schilddrüse, beispielsweise mit Methylthiouracil, der Mauserungsvorgang nicht gebremst sondern gerade ausgelöst, wie dies Halberkann bezüglich der Häutung nach Methylthiouracil-Gaben ebenfalls feststellte (siehe auch v. Buddenbrock 1950, S. 55).

Im Hinblick auf den zentralen, wenn auch dem oben Gesagten nach noch *widerspruchsvollen* Einfluß der Schilddrüse auf den Häutungsverlauf der Ophidier, liegt die Frage nahe, ob die in der Literatur mehrfach beschriebene antithyreoidale Wirkung des Thymus auch bei der Ringelnatter eine Auswirkung auf den Häutungscyclus zeigt. Der histologisch nachweisbaren Inaktivierung der Schilddrüse müßte dann im Sinne der Halberkannschen Befunde eine außerhalb der physiologischen Schwankungsbreiten liegende Verkürzung der Häutungsphase parallel gehen. Schließlich sind die histologischen — und topochemischen — Veränderungen an den Organen des endokrinen Systems und des Stoffwechsels zu erfassen und in Relation zu bereits bekannten Wirkungen anderer Hormone bzw. Organextrakte zu setzen.

Diese Frage erscheint um so verlockender, als die klinisch üblichen, schilddrüsenbremsenden Thiouracile zwar auch bei Natrix zu einer Alteration führen; die starke toxische Nebenwirkung der Uracile sowie ihre Komplexität der Wirkungsweise (siehe Kopf, Loeser u. Meyer 1948) erschweren jedoch die klare Beurteilung der experimentellen Ergebnisse. Eine genaue Umschreibung der Schilddrüsenfunktion bei der Häutungsphase ist damit aber noch nicht weiter vorgetrieben.

Dagegen dürfte bei einem antagonistischen Faktor endokriner Natur die toxische Komponente weitgehend vermindert sein. Ein weiterer Gesichtspunkt wäre, ob eine mögliche Wirkung im wesentlichen über die Schilddrüse oder noch über andere endokrine Organe zustandekommt oder ob sich gar eine selbständige direkte Beeinflussung durch den Thymus feststellen läßt.

Während der Prozeß der Epidermiserneuerung bei den Säugern langsam abläuft (Desquamatio insensibilis), regenerieren die Schlangen ihre Epidermis cyclisch innerhalb eines relativ kurzen, dazu individuell nur gering schwankenden Zeitraumes[1]. Sie ermöglichen daher nicht nur die physiologischen Bedingungen dieser Epidermiserneuerung in Abhängigkeit von endokrinen Vorgängen zu erforschen, sondern lassen auch Abweichungen unter experimentellen Bedingungen gut erkennen. Sie dienen damit — wie Vonkennel vor einigen Jahren anregte — als Modell der experimentellen Klärung der Keratinisierungsprozesse.

Ein dermatologisches Interesse für diese Fragen ergab sich schließlich aus Mitteilungen von Schreiner, Gross, Jindrich, Caritlon und Ward (zitiert nach Stümpke 1934) sowie von Liebner (siehe Jores 1949, S. 262), die auf eine erfolgreiche Therapie der Psoriasis mit verschiedenen Thymusextrakten hinweisen; auch Bernhard teilte auf dem letzten Symposion für Endokrinologie (Freiburg, März 1957) die Heilung eines mit schwersten Generalisierungserscheinungen behafteten Psoriatikers durch einen solchen Extrakt mit.

Material und Methode

Für die Untersuchungen, über die ich bereits an anderer Stelle kurz berichtete (Goslar 1957b), wurden bisher 19 Exemplare von Natrix natrix (weibliche Tiere) verwendet. Die Tiere waren unter gleichmäßigen Terrarienbedingungen (Ausführliches hierüber siehe Goslar 1957a) $^3/_4$ Jahr auf den Verlauf des Häutungscyclus beobachtet worden. Durchschnittsgewicht der Tiere 100 g. Gleichzeitig wurden Kontrolltiere (15 Stück) auf etwaige durch äußere Einflüsse bedingte Abweichungen (Witterung, Futter) des Häutungscyclus mitbeobachtet. Kontrolltiere und Versuchstiere erhielten gleiche Futtermengen (pro Woche 2 junge Regenbogenforellen im Durchschnittsgewicht 20—30 g), was im Hinblick auf die Fütterungsversuche von Romeis (1940) besonders erwähnt sei. Dreimal wöchentlich wurden dann folgende Dosen Thymusextrakt i.m. in den Schwanzteil injiziert: 0,25 cm³ 3 Tiere, 0,5 cm³ 14 Tiere, 1,0 cm³ 1 Tier, 0,75 cm³ 1 Tier. Außerdem wurden 3 Tieren zu den gleichen Zeiten 0,5 cm³ physiologische Kochsalzlösung appliziert.

Der verwendete wäßrige Extrakt wurde nach dem von Jaeger und Mittenzwei (1957)[2] entwickelten Verfahren aus dem Thymus von Kälbern gewonnen, die durch eine partielle Hämolyse innerhalb von etwa 36 Std einen Milztumor entwickeln[3]. Die Milz sowie der Thymus dieser Tiere zeigen histologisch die Zeichen außerordentlich hoher Aktivität (Ferner) speziell der Reticulumzellen. Nach Pichotka wirkt der Extrakt bei Meerschweinchen stark temperatursenkend, was auf die Bremsung der Schilddrüsenfunktion bezogen wird. Der Extrakt ist eiweiß- und pyrogenfrei; 1 cm³ entspricht 5 g der aktivierenden Frischdrüse.

Die Abgrenzung der einzelnen Phasen des Häutungscyclus erfolgte nach dem von Halberkann (1952—1954) beschriebenen und von Goslar (1957a) histologisch und topochemisch ausführlich behandelten Schema:

[1] Gleichbleibende Umweltsbedingungen vorausgesetzt.

[2] Den Herren Dr. Jaeger (Freiburg i. Br.) und Dr. Mittenzwei (München) danke ich herzlich für alle Informationen über die biochemische und biologische Charakterisierung dieses Extraktes.

[3] Für die Überlassung des nach oben angeführten Verfahren hergestellten Extraktes bin ich der Fa. Hormon-Chemie, München, zu Dank verpflichtet.

Häutungsfreies Intervall: von Tier zu Tier wechselnd, durchschnittlich 21 bis 28 Tage

Bauchtrübung:	2 Tage	Häutungsphase durchschnittlich 7—8 Tage
Bauch- und Augentrübung:	2 Tage	
Klarung:	2—3 Tage	
Häutung:	1 Tag	

Nach Versuchsbeendigung wurden die Tiere durch Dekapitation getötet und Haut, Leber, Milz, Pankreas, Thyreoidea, Thymus lebendfrisch in Formol-Calciumchlorid nach Baker (siehe Pearse 1954) sowie in Bouin fixiert (Fixationsdauer 12—24 Std bei 4° C im Eisschrank); Einbettung in Celloidin-Paraffin nach Péterfi, Schnittdicke 7,5—10 μ.

Färbungen. HE, Pasini, Chromhämatoxylin-Phloxin nach Gomori, Tannin-Eisen nach Salazar. Über die histotopochemischen Befunde sowie über weitere Organbefunde wird an anderer Stelle berichtet.

Befunde

1. Allgemeines

Zunächst sei das Allgemeinverhalten der Tiere beschrieben. Die Applikationen wurden gut vertragen. Die Injektionsstellen (seitlicher Schwanzteil in etwa 1 cm Abstand caudal der Kloake) bleiben reizlos. Die Tiere werden zunächst lebhaft, die Freßlust steigert sich. Nach 2 bis 3 Wochen zeigen sie wieder ihr normales Verhalten, um nach 5 bis 6 Wochen in eine trägere, aber keineswegs lethargische Phase zu gelangen. Diese hält dann an. Die Reaktion auf Schreckreize und auf Futterdarreichung zeigt jedoch nur geringe Minderung. Änderungen im Längenwachstum wurde auch nach 3monatlicher Applikation nicht beobachtet; das Gewicht bleibt im wesentlichen konstant.

Die erste auffällige Reaktion ist die nach 12—14 Tagen deutlich wahrnehmbare Dunklung der Rückenhaut, die nach 3 Wochen ein Maximum erreicht. Vorher hellgraue Tiere erscheinen jetzt dunkel bis schwarzgrau (vgl. auch Goslar 1957 c). Die Farbverteilung als solche, z. B. bei schwarzgrau gesprenkelten Tieren ändert sich nicht. Im Bereich der Bauchhaut, wo die Melanophoren in Aggregaten mit einer für jedes Tier charakteristischen „Zeichnung" zusammenliegen, erfolgt dagegen keine sichtbare Veränderung. Sie ist auch nicht zu erwarten, weil sich außerhalb eines solchen Aggregates nur vereinzelte Melanophoren finden, deren etwaige Expansion gar nicht in Erscheinung treten würde (vgl. hierzu auch die Befunde von Jöchle 1957 an der isolierten Amphibienhaut).

Nach weiteren 3 Wochen erfolgt trotz weiterer regelmäßiger Extraktapplikation wieder eine Aufhellung; die Ausgangsfarbe wird fast wieder erreicht. Eine erneute Dunklung erfolgt danach nicht mehr.

Eine besonders eindrucksvolle Wirkung der Extraktapplikation stellen die Abweichungen im Häutungscyclus dar. Betrugen die häutungsfreien Intervalle *vor* den Injektionen durchschnittlich 25 Tage, die Häutungsphasen selbst 7—9 Tage, so ist — je früher die Injektionsserie

nach der letzten Häutung beginnt — schon das nächste häutungsfreie Intervall deutlich gekürzt. Diese Verkürzung nimmt im folgenden ständig zu und kann schließlich nach 3—4 Cyclen bis über 50% betragen, wie aus Tab. 1 zu ersehen ist. Die unmittelbar *vor* einer zu erwartenden Häutungsphase injizierten Tiere zeigen zumindest nach dem übernächsten Cyclus die beschriebene Verkürzung. Die Häutungsphase *selbst* wird dagegen ablauf- und zeitmäßig auch nach 4monatiger Applikation nicht beeinflußt.

Die geschilderte Verkürzung bleibt jedoch nach den bisherigen Beobachtungen nicht konstant. Nach etwa 4—5 Monaten nimmt das häutungsfreie Intervall zeitlich wieder zu, erreicht jedoch niemals den ursprünglichen Wert. Die Zunahme erfolgt bei der 0,25 cm^3-Gruppe rascher als bei der 0,5 cm^3-Gruppe.

Zur Wahl der Dosis sei noch bemerkt, daß die Tiere mit Injektionen von 0,75 und 1,0 cm^3 bald ein sehr träges Verhalten zeigten und der Muskeltonus stark herabgesetzt war. Da andererseits bei Applikation von 0,25 cm^3 die vorher beschriebenen Effekte zwar noch deutlich nachweisbar, aber quantitativ geringer sind, wurde für die weiteren Versuche die Applikation von 0,5 cm^3 3mal wöchentlich gewählt.

Neben dem erwähnten Melanophoreneffekt zeigen Haut und sichtbare Schleimhäute zunächst makroskopisch keine Veränderungen. Nach etwa 14 Tagen erscheint die Haut glänzender und straffer. Nach 4 Wochen und in der Folgezeit wird sie immer matter; ihre Konsistenz ist jetzt derber, hier und da lassen sich atrophische Bereiche beobachten. Sprödigkeit sowie Verhornungsanomalien konnten bei keinem Tier und in keinem Stadium des Versuches registriert werden. Auch bei den Vorgängen der Häutungsphase selbst ließen sich keine Besonderheiten feststellen.

2. Histologische Befunde

a) Haut. Die vorliegenden Befunde stellen Vergleiche zu den an Hand eines größeren Materials gewonnenen „Normalbildern" der jeweiligen Stadien im Häutungsgeschehen dar (vgl. Goslar 1957a); für Einzelheiten sei deshalb auf diese Arbeit verwiesen.

Unmittelbar nach der Häutung der Versuchstiere zeigt die Basalschicht zahlreiche Unregelmäßigkeiten in Zellform, -lage und -größe. Die Zellen sind stark vermehrt und dicht gedrängt, ihre palisadenförmige Anordnung ist aufgehoben. Auch die Kernform erscheint unregelmäßig; schmale, lange, chromatinreiche Kerne wechseln mit ovalen oder rundlich geformten und den üblichen Chromatinbestand zeigenden Individuen. Manchmal ist das Chromatin auch bröckelig dargestellt, und zwar unabhängig von den angewendeten Fixierungen. Die Kernmembran ist in solchen Zellen durch Anlagerungen verdickt, wie es allgemein bei Zellen mit abweichendem Stoffwechselgeschehen beschrieben wird. 2 Nucleoli sind häufig. Das Cytoplasma zeigt bei allen Fixierungen häufiger

Tabelle 1. *Als Beispiel seien die Daten von 7 Tieren angeführt*

Tier Nr.	Dosis	häut. fr. I *vor* der Applikat. Tage	Häut. Phase Tage	häut. fr. I *nach* der Applikat. Tage	Häut. Phase Tage
K 19	0,25 cm³ 20 Tage nach Häutung	25	8	10	7
		22	8	10	8
		26	7	10	8
				15	7
				10	7
				13	8
				12	7
L 17	0,25 cm³ 8 Tage nach Häutung	34	8	14	7
		28	9	15	8
				13	8
				14	8
				12	8
				11	7
				20	8
K 7	0,5 cm³ in der Klarung	26	7	15	8
		22	8	6	7
		20	8	8	7
				8	7
				8	7
				7	8
K 13	0,5 cm³ 2 Tage nach Häutung	31	8	14	7
		Eiablage!	7	12	7
		15	7	11	8
		21		10	7
				13	9
				18	8
				14	7
P 4	0,5 cm³ 1 Tag nach Häutung	25	7	18	9
		22	8	15	
		25	8		
M 13	0,75 cm³ 6 Tage nach Häutung	45	7	10	7
		32	8	8	8
				8	6
				13	8
				16	7
K 3	1,0 cm³ 19 Tage nach Häutung	32	7	16	8
		27	9	13	8
		25	8	12	9

Vacuolen als dasjenige entsprechender Kontrolltiere. Mitosen sind ebenfalls zahlreicher. Auch in der Schicht polygonaler Zellen beobachtet man neben ihrer ebenfalls größeren Zelldichte und einer auch hier noch wahrnehmbaren Unregelmäßigkeit der Zellanordnung eine gehäufte

Veränderung der Kerne: Eindellung der Membrane, Anlagerungen von Chromatin an dieselbe, Randständigkeit der Nucleoli. Weiterhin enthalten diese Zellen viel Keratohyalin. Die Keratinschicht bietet gegenüber den Kontrolltieren keine Besonderheit. Die Cutis ist aufgelockert, die kollagenen Fasern verquollen. Im Stadium starker Dunklung sind

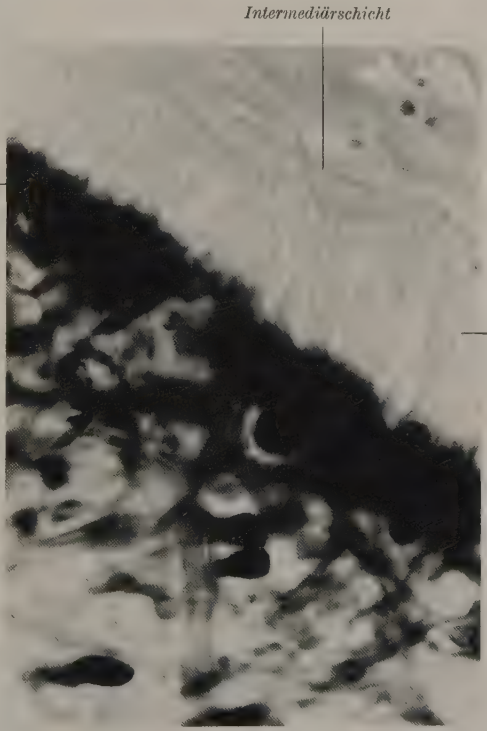


Abb. 1. Natrix natrix L., mit 0,5 cm³ Thymusextrakt behandelt. *Haut* im Stadium der starken Bauch- und Augentrübung. Bouin-Fixierung. Paraffinschnitt 10 μ. Tannin-Eisenfärbung nach SALAZAR. Vergrößerung 950fach; auf 9/10 verkleinert

die Melanophoren so stark expandiert, daß sie eine fast geschlossene Schicht unter der basalen Faserplatte der Cutis bilden (Abb. 1).

Die gegenüber den Kontrolltieren herausgestellten Unterschiede bleiben auch zu Beginn einer Häutungsphase — also im Stadium der Bauchtrübung — erhalten. Neben Unregelmäßigkeiten in Lage und Form der Basalzellen und ihrer Kerne ist die Verbreiterung der Intercellularräume bemerkenswert (Abb. 2). Im Tannin-Eisenpräparat sind hier reichlich Tonofibrillen sichtbar. Mit der Chromhämatoxylinfärbung stellen sich in den Basalzellen größere Mengen blauschwarzer feiner Granula dar, während im gleichen Stadium bei den Kontrolltieren dort die Granulamenge vermindert ist. Die Intermediärschicht ist ebenfalls

sehr aufgelockert. Die junge Hornschicht enthält viel Keratohyalin; auf histochemische Unterschiede soll jedoch erst an anderer Stelle eingegangen werden. Die Grenzfläche alte — junge Hornschicht zeigt mit den angegebenen Methoden keine Abweichungen von dem bereits Beschriebenen (Goslar 1957 a). Die Cutis ist stark aufgelockert, die kollagenen Fasern der Basalplatte gequollen und auseinandergedrängt.

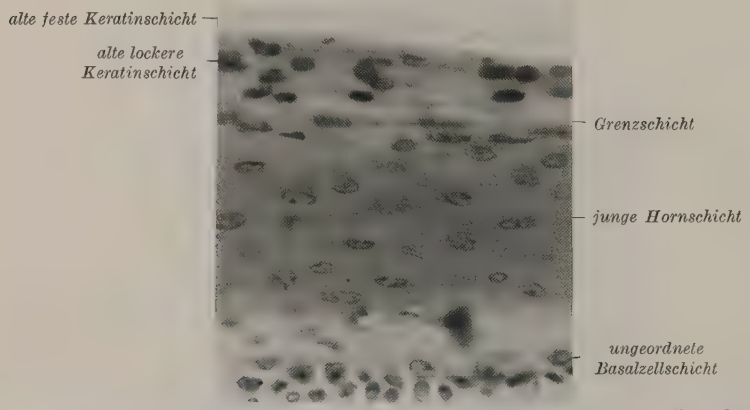


Abb. 2. Natrix natrix L., mit 0,5 cm³ Thymusextrakt behandelt. *Haut* im Stadium der starken Bauch- und Augentrübung. Bouin-Fixierung. Paraffinschnitt 10 μ. Hämatoxylin-Eosin. Vergrößerung 400fach

b) Schilddrüse. Wie schon bereits Eggert (1935) bei Lacerta beschrieb und von mir auch bei Natrix bestätigt werden konnte (noch unveröffentlicht), befinden sich Follikelgröße sowie die Höhe des Follikelepithels in einem phasischen, dem Häutungsgeschehen zugeordneten Wechsel. Während kurz nach der Häutung, also zu Beginn eines neuen Cyclus, die Schilddrüse ein Bild verminderter Aktivität zeigt — Abnahme der Follikelgröße, Erniedrigung des Follikelepithels — nimmt letztere in der zweiten Hälfte des häutungsfreien Intervalls bis zum Beginn einer Häutungsphase stetig zu (Abb. 3a), um mitten in diesem Status (starke Bauch- und Augentrübung) ihr Maximum zu erreichen. Demgegenüber erscheint die Thyreoidea behandelter Tiere schon nach 3 Wochen wesentlich verändert. Makroskopisch erscheint sie kleiner und glasiger. Im mikroskopischen Bild ist die Menge des Kolloides vergrößert (Bild der Stauungs-Schilddrüse) (Abb. 3b). An der Grenze zum Epithel zeigen sich durch Fixation bedingte Schrumpfräume (vgl. die entsprechenden Befunde bei Eggert 1936). Das Follikelepithel ist in allen Phasen des Häutungsgeschehens ungewöhnlich niedrig[1]. Die Zellkerne zeigen eine

[1] Eine interessante Parallele ergibt sich hier zu den Befunden von Ottaviani u. Azzali (1955). Bei hohen Dosen von Zwischenhirn-Lipoidextrakten beobachteten diese Autoren bei Hunden eine starke Kolloidvermehrung, Änderung der Anfärbbarkeit desselben sowie Verflachung des Follikelepithels.

dichte, aber bröckelige Chromatinstruktur, die Kernmembran ist verdickt. Parafollikuläre Zellnester mit chromatinreichen Kernen kommen vereinzelt vor. Bei etwa 2 Monate behandelten Tieren nimmt auch die

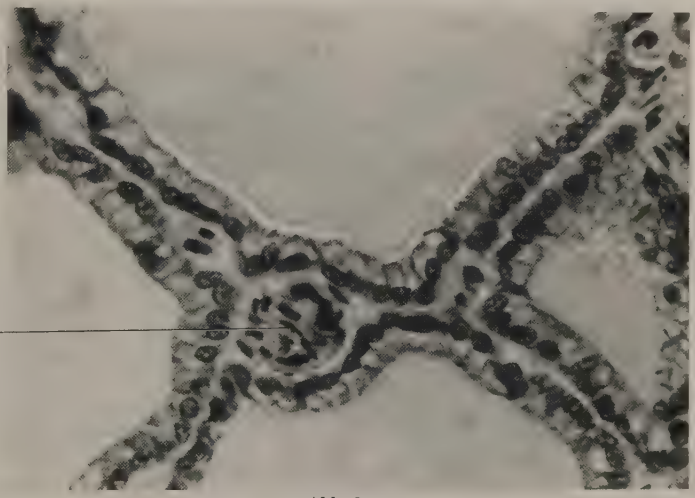


Abb. 3a

Abb. 3a. Natrix natrix L. Unbehandeltes Kontrolltier; Stadium der Bauch- und Augentrübung. *Schilddrüse* auf der Höhe ihrer Aktivität. Formol-Calciumchlorid-Fixierung nach BAKER. Paraffinschnitt 7,5 μ. Hämatoxylin-Eosin. Vergrößerung 525fach; auf 9/10 verkleinert

Abb. 3b

Abb. 3b. Natrix natrix L., mit 0,5 cm³ Thymusextrakt behandelt. Gleiches Stadium wie bei 3a. *Schilddrüse* mit dem Bilde der Kolloidstauung. Fixierung und Färbung wie 3a. Vergrößerung links 100-, rechts 525fach; auf 9/10 verkleinert

Follikelgröße merklich ab; das Epithel besteht nur noch aus einem äußerst schmalen Saum. Alle Stadien des Häutungscyclus zeigen fast das gleiche Bild, eine Differenzierung der einzelnen Phasen ist nicht mehr möglich (Abb. 3b).

c) Thymus. Einer Beschreibung der auch hier recht eindrucksvollen Abweichungen von den Kontrolltieren möge eine kurze Literaturzusammenstellung über die Topographie und Histologie dieses Organs bei Natrix vorausgehen.

Das Organ besteht aus jeweils 2 etwa 0,2 cm großen Körperchen, welche neben der A. carotis und dem N. vagus über und in Höhe mit der Thyreoidea gelagert sind (van Bemmelen 1888, weitere Literatur siehe Pischinger 1937, Bargmann 1943). Das Organ gleicht nach van Bemmelen dem der Eidechse (vergl. auch Maurer 1898, 1899). Im histologischen Bild fallen große, konzentrische fibrillenähnliche Streifen enthaltende Zellen — die sogenannten myoiden Zellen (Mayer 1888 u. a., Teichmann 1942, Bargmann 1943, dort ausführlich Literatur) auf, welche teils in dem lymphatischen Gewebe liegen, teils vereinzelt strangartige Formationen bilden (Abb. 4a). Auf zahlreiche fließende Übergangsformen zu den Reticulumzellen wurde von Hammar (1909, S. 101) hingewiesen. Gleichgestaltige Zellen kommen beispielsweise auch im Thymus von Eidechsen vor und wurden kürzlich noch von Rao (1955) bei Colotes versicolor beschrieben. Dieser Autor bezeichnet jedoch die Gebilde als „unicellular Hassals corpuscules", worin ich ihm jedoch nicht folgen kann. Im übrigen ist die Auffassung, daß die „myoiden" Zellen den Hassalschen Körperchen gleichzustellen sind, schon von Bolau (1899) und von v. Ecke (1899) vertreten worden von Ecke leugnete sogar die pluricelluläre Beschaffenheit der Hassalschen Körperchen.

Im Goldner- und Pasinipräparat enthalten die Zellen zahlreiche rottingierte Granula, welche in konzentrischen Lamellen angeordnet sind, wie es zuletzt noch von Teichmann (1942) an Azanpräparaten beschrieben wurde. Hinsichtlich der Kontrolltierbefunde sei auf diese sehr detaillierte Arbeit verwiesen.

Phasische Veränderungen im Thymus während des Häutungscyclus konnte ich bisher nicht feststellen; jedenfalls sind den Schilddrüsenbefunden entsprechende charakteristische Unterschiede nicht zu sehen. Infolge unserer Haltungsbedingungen fallen die Tiere auch nicht in den Winterschlaf. Deshalb war das von Teichmann (1942) geschilderte Bild der Thymus-Involution nicht zu erwarten und wurde auch nicht beobachtet.

Schon nach 3wöchiger Versuchsdauer bietet der Thymus ein wesentlich verändertes Bild. Das lymphatische Gewebe ist weitgehend zurückgedrängt, an seine Stelle sind die „myoiden" Zellen getreten, welche sich zu einem vor allem im Markbereich gelegenen Netzwerk zusammenlagern. Die Durchschnittsgröße dieser Zellen hat erheblich zugenommen. Sonst finden sich im HE-Präparat aber keine Abweichungen (Abb. 4b). Im *Pasini*präparat ist die Zahl der rottingierten Granula vermehrt und die lamellären Strukturen verdichtet. Die Zellkerne sind groß, blasig, enthalten wenig Chromatin und eine stellenweise verdickte Kernmembran. Degenerierende „myoide" Zellen (vgl. hierzu die Ausführungen von Teichmann 1942) finden sich in den vorliegenden Präparaten auffallend selten. Weitere Aussagen sind jedoch erst nach Abschluß der laufenden histochemischen Untersuchungen möglich. Die Capillarisierung des Gewebes erscheint recht dicht, viele Capillaren und auch größere Gefäße werden von den Zellen umhüllt.

Neben diesem Zelltyp sind auch die eigentlichen Reticulumzellen deutlich vergrößert. Manche nähern sich dabei in der Form den „myoiden Zellen, enthalten aber im Pasinipräparat bedeutend weniger Granula. Sie gleichen in etwa den von HAMMAR (1905) in Abb. 6 (Froschthymus) in

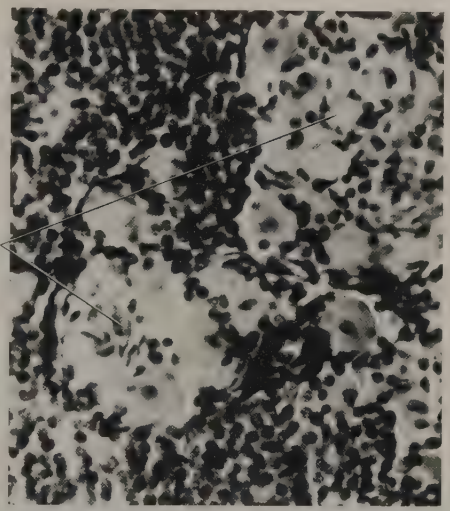


Abb. 4a. Natrix natrix L. Unbehandeltes Kontrolltier. Stadium der Bauch- und Augentrübung. *Thymus*. Bouin-Fixierung. Paraffinschnitt 7,5 μ. Hämatoxylin-Eosin. Vergrößerung 400fach; auf 9/10 verkleinert

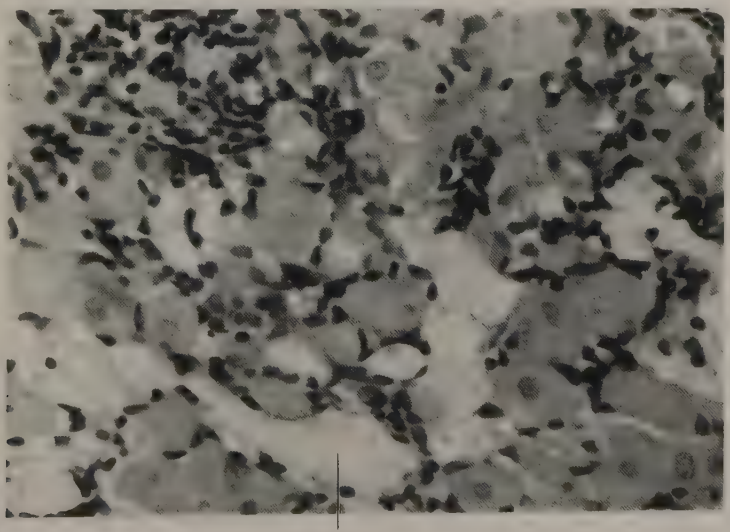


Abb. 4b. Natrix natrix L., mit 0,5 cm³ Thymusextrakt behandelt. Stadium wie 4a. *Thymus* Bouin-Fixierung. Paraffinschnitt 7,5 μ. Hämatoxylin Eosin. Starke Vermehrung und Vergrößerung der sogenannten „myoiden" Zellen. Vergrößerung 400 fach; auf 9/10 verkleinert

der Bildmitte wiedergegebenen Zellen. Zellaggregate, die den Hassalschen Körperchen vergleichbar sind, finden sich bei diesem Versuchsstadium nur selten (vgl. dagegen den Befund an Normaltieren von Teichmann auf S. 198, 1942).

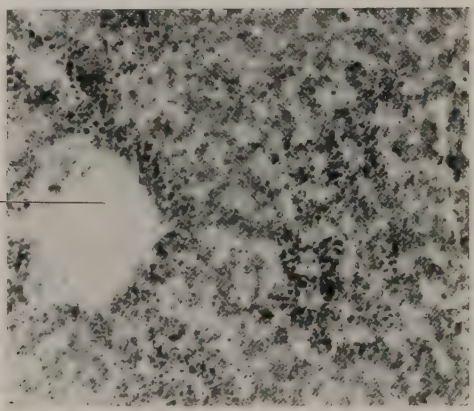


Abb. 5a

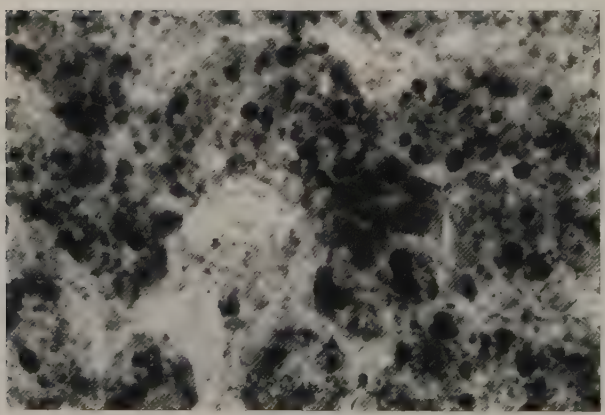


Abb. 5b

Abb. 5. Natrix natrix L., mit 0,75 cm³ Thymusextrakt behandelt. Stadium 10 Tage nach der Häutung. *Leber*. Formol-Calciumchlorid-Fixierung nach Baker. Gefrierschnitt 15 μ. Sudanschwarz-Färbung. a Vergrößerung 100fach; auf 9/10 verkleinert; b Vergrößerung 400fach; auf 9/10 verkleinert

Unmittelbar medial über der Schilddrüse ist bei Natrix ein normalerweise höchstens 0,5 cm langer, schmaler Fettkörper gelegen, in dessen Bereich sich der obere Thymuslappen (Thm. I der Abbildung bei van Bemmelen 1888) befindet. Dieser Fettkörper ist bei den extraktbehandelten Tieren mächtig vergrößert (bis zu 1,2 cm Länge und 0,4 cm

Breite), und zwar auf Grund einer Hypertrophie der einzelnen Fettzellen. Auch im Mesenterialfettgewebe findet sich eine gleichsinnige Vergrößerung.

d) Leber. Die Leber zeigt nach 6—8wöchiger Extraktapplikation eine stärkere Proliferation des periportalen Bindegewebes, was sich besonders auch an Tannin-Eisenpräparaten demonstrieren läßt. Die Gesamtstruktur erscheint sonst nicht verändert. Das Cytoplasma ist — zentral stärker als peripher — mit feinen Vacuolen durchsetzt, Fettfärbungen (Sudanschwarz) lassen hier eine zentrale, grob- bis mitteltropfige Verfettung erkennen (Abb. 5a, b). Die Zellkerne sind kaum

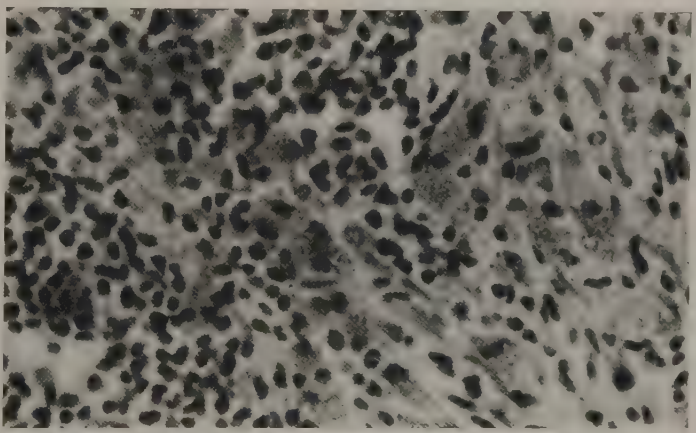


Abb. 6. Natrix natrix L., mit 1 cm³ Thymusextrakt behandelt. Stadium 1 Tag nach der Häutung *Milz.* Bouin-Fixierung. Paraffinschnitt 7,5 μ. Hämatoxylin-Eosin. Vergrößerung 525fach; auf 9/10 verkleinert. Zahlreiche eosinophil granulierte, histiocytäre Zellen

charakteristisch verändert. Einige besitzen im HE-Präparat rottingierte Kernkugeln, welche sich durch ihre Anfärbung von den häufig vergrößerten, aber blau erscheinenden Nucleoli differenzieren lassen (vgl. die Ausführungen von Berg 1934, Schiller 1944, 1948, 1949 sowie Altmann 1955). In Übereinstimmung mit Schiller (1948) finden sich solche Gebilde nur in großen Zellkernen. Chromatinveränderungen (Bröckelbildung, Verdichtung) treten nie über das auch bei jedem Kontrolltier hier und da zu Beobachtende auf, die Kernmembran zeigt keine Besonderheiten.

Die Kupfferschen Sternzellen erscheinen oft stark granuliert, ein gehäuftes Auftreten von Kerneinschlüssen ist hier jedoch nicht zu beobachten.

e) Milz. Die Milz besitzt bei Natrix eine dünne Kapsel, von welcher zahlreiche Septen in das Innere verlaufen. Alle von mir untersuchten Normaltiere weisen dünne Trabekel auf, so daß ich die von Hartmann (1930) in Abb. 1 wiedergegebenen Strukturen nicht als Norm bezeichnen möchte. Die Trennung zwischen roter und weißer Pulpa ist — wie auch

bei anderen Reptilien (Schlangen s. Hoffmann 1890, Lacertiden z. B. siehe Hoyer 1892) — bei weitem nicht so ausgeprägt wie bei der Säugermilz. Quantitative Unterschiede lassen sich aber unter den vorliegenden Versuchsbedingungen nur schwer erfassen; ich habe mich deshalb im Anschluß an Tischendorf (1957) darauf beschränkt, die Unterschiede schätzungsweise zu beurteilen.

Bei den behandelten Tieren ist die Milz stark vergrößert. Das Auftreten weißer, herdförmiger Flecken an der Oberfläche zeigt schon makroskopisch eine starke Verdickung der Kapsel an, die im histologischen Präparat ebenfalls zu belegen ist. Auch das die Balken bildende Bindegewebe erscheint vermehrt; es kommt somit zu einer ausgeprägten Septierung. Die rote Pulpa hat mengenmäßig zugenommen. Besonders auffällig ist die massive Vermehrung eosinophiler histiocytärer Elemente in Kapsel, Balken und Pulpa (Abb. 6). Die eosinophilen Granula sind grob und gleichmäßig über die ganze Zelle verteilt, der Kern weist keine Besonderheiten auf. In diesem Zusammenhang sei auf gleichartige Befunde von Tischendorf (1957) an der Säugermilz nach Diencephalon-Lipoidextrakten hingewiesen. Auch dieser Autor betont die mesenchymale Abstammung der granulierten Zellen. Für den histiocytären Charakter sprechen weiterhin die oft noch Ausläufer enthaltenden Formen, der Einbau in das Bindegewebe, insbesondere das der Kapsel und Trabekel und das Vorhandensein von Kerntrümmern in ihrem Cytoplasma.

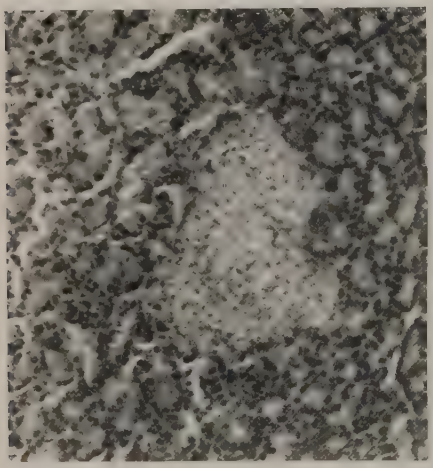


Abb. 7. Natrix natrix L., mit 0,5 cm³ Thymusextrakt behandelt. Stadium der Bauch- und Augentrübung. *Pankreas mit Langerhansscher Insel.* Formol-Calciumchlorid-Fixierung nach Baker. Paraffinschnitt 7,5 μ. Hämatoxylin-Eosin. Vergrößerung 100fach

f) Pankreas. Die Befunde an diesem Organ seien hier nur kurz gestreift. Während mit den angewandten Methoden sich im exokrinen, periinsulären Teil eine stärkere Anfärbbarkeit aufzeigen läßt, sind die Inseln vergrößert. Ihre Volumenzunahme übertrifft dabei die von Moscona (1954) beschriebene und an Hand meiner Präparate sich bestätigende Größenzunahme während der Eireifung oder kleinerer Größenschwankungen während des normalen Häutungscyclus (Abb. 7)[1]. Die

[1] Ausführliche histologische und planimetrische Untersuchungen sind noch im Gange.

Inselgrenze verläuft dabei recht unregelmäßig; immer wieder dringen Ausläufer des Inselgewebes in den exokrinen Bereich ein. Cytologisch bieten die Zellelemente mit den beschriebenen Methoden zunächst keine Besonderheiten. Auf analoge Befunde an dem Kaninchen-Pankreas nach Applikation von Diencephalon-Lipoidextrakt (Spigolon 1955) sowie an dem Rattenpankreas nach Gaben von Oestrogenen (Houssay 1951) sei hier des Vergleiches halber hingewiesen.

Besprechung der Befunde

Bei der Fülle der über die Wirkung von Organextrakten verschiedenster Art und Herstellung vorliegenden Untersuchungen (als Beispiele seien hier nur die Arbeiten mit Zwischenhirn-Lipoidextrakten von Curri und Fedeli 1955, 1956, Fedeli, Curri u. Tambuscio 1955, Ottaviani u. Azzali 1955, Spigolon 1955, Tischendorf 1957, ferner mit Leberextrakten Gros u. Kirnberger 1954, Eger 1956 und Ovarial-Totalextrakten Ratschow 1950 angeführt) seien hinsichtlich der vorliegenden Untersuchungen und zum Vergleich mit anderen Arbeiten folgende Fragen herausgegriffen:

1. Sind die beobachteten Veränderungen, insbesondere an der Schilddrüse, spezifisch für den angewendeten Extrakt aus aktivierten Thymi oder lassen sich gleiche Wirkungen auch mittels anderer Extrakte bzw. Substrate erzielen? Handelt es sich um ein organspezifisches Wirkungsprinzip, oder ist dies in geringerer oder größerer Menge auch in anderen Organen enthalten?

2. Handelt es sich bei den beschriebenen Befunden um die Wirkung eines bestimmten lymphatischen oder reticulären Systems derart, daß grundsätzlich die gleichen Ergebnisse auch mit anderen Teilen des Systems, also nicht nur mit Thymus, sondern auch mit Milz, Lymphknoten, Tonsillen usw. zu erzielen sind? (Vgl. auch Knipping u. Rieder 1924.)

3. Welche Anhaltspunkte ergeben sich aus den Befunden für die Hemmung der Schilddrüse?

4. Lassen sich aus dem Vorliegenden weitere Gesichtspunkte für die Korrelationen zwischen Schilddrüsenfunktion und den Häutungsvorgängen, insbesondere dem Problem der Keratinisierung entnehmen?

Der hier angewendete Thymusextrakt wird stets in gleicher Weise aus histologisch kontrollierten, die beschriebenen Zeichen der reticulären Aktivität aufweisenden Thymi hergestellt und erweist sich nach biochemischen Kriterien in verschiedenen Chargen als gleichmäßig reproduzierbar (Jaeger u. Mittenzwei).

Die hier vorgelegten Befunde ließen sich mit verschiedenen Chargen in gleicher Weise gewinnen[1]. Der verwendete Extrakt unterscheidet sich in manchen Kriterien von dem bisher beschriebenen bzw. im Handel

[1] Es muß jedoch darauf hingewiesen werden, daß nach meinen bisherigen Erfahrungen die Extraktwirkung nach etwa $^3/_4$ Jahren auch bei Aufbewahrung im Dunkeln und im Eisschrank nachläßt; nimmt man dann eine frische Charge beim gleichen Tier, so reproduzieren sich die Ergebnisse wieder vollständig.

befindlichen[1]. Der Schwerpunkt des Unterschiedes muß dabei auf die vorherige Aktivierung des Thymus gelegt werden; so nimmt auch Hoepke (1955) an, daß z. B. eine vorher aktivierte Milz „wesentlich mehr Abwehrstoffe enthält als eine embryonale oder normale Milz" (S. 273).

Bei der Extraktapplikation mag man nun einwenden, daß die *Wirkstoffe* — sei es, daß dieselben nicht vollständig erfaßt, sei es, daß sie beim Extraktionsprozeß verändert werden — nicht in der *ursprünglichen* Form vorlägen. Zweifellos verdient dieser Einwand besonders bei der nach wie vor noch ungeklärten Natur der Thymuswirkstoffe Beachtung; (neben dem Für und Wider eines thymuseigenen Hormons wird auch die Beteiligung des hohen Vitamingehaltes an den beobachteten Effekten diskutiert, siehe Romeis 1940, S. 701, und die dort zitierten Autoren). Dem kann jedoch entgegengehalten werden, daß der Extrakt

a) ja die der Verfütterung (Literatur siehe u. a. Romeis 1940, Comsa 1956) gleichgerichtete und sogar gesteigerte Wirkung zeigt,

b) Unsicherheitsfaktoren, wie Resorption und Umwandlung im Magen-Darmtrakt, wegfallen und

c) eine exakte, auf Frischdrüsengewicht zu beziehende Dosierung möglich ist.

Zum Problem der Reaktionsspezifität eines Organextraktes haben in letzter Zeit Eger (1956), Vorlaender (1956) und Tischendorf (1957) Stellung genommen. Der erste Autor erwähnt im Hinblick auf seine Untersuchungen über die Verhinderung von Leberparenchymschäden durch Leber- und Milzextrakte, daß die Frage der Spezifität der Organextrakte noch „völlig offen" sei. Er hält den Einfluß auf Parenchymschäden für weitgehend unspezifisch. Jedoch konnte Eger wohl Wirkungs-*Unterschiede* nachweisen: Nach gleichem Verfahren hergestellte Herz- und Nierenextrakte besitzen *nicht* die für Leber- und Milzextrakte beobachtete Schutzwirkung. Tischendorf (1957) weist in seiner Arbeit über die Beeinflussung der Milz durch Zwischenhirn-Lipoidextrakte ausdrücklich darauf hin, daß in den Milzen behandelter Tiere keine Formationen bzw. Elemente aufträten, welche nicht auch schon in der normalen Milz vorgebildet seien. Demnach dürfte also von einer spezifischen Wirkung im Sinne der pathologischen Anatomie nicht gesprochen werden. Auch bei den hier vorliegenden Befunden mit Thymusextrakt wird man bei *isolierter* Organbetrachtung eine spezifische Reaktion nicht finden. Die Abflachung des Schilddrüsenepithels ist beispielsweise auch mit Zwischenhirn-Lipoidextrakten in hoher Dosierung zu erreichen (Ottaviani u. Azzali); gleiches gilt für die Vergrößerung der Inselzellen des Pankreas (Spigolon 1955 und eigene Befunde), die unter anderem auch bei der Applikation von Östrogenen eintritt (siehe Moscana 1955) sowie für die Milzbefunde (Spigolon, Tischendorf). Für die Charakterisierung einer Organextraktwirkung ist deshalb nur die *komplexe* Schau der Reaktionen vieler Organe und Gewebssysteme maßgebend. Es wäre somit dem Problem zuträglicher, nicht von einer „spezifischen Wirkung", sondern von einem charakteristischen „Wirkungssyndrom" — allenfalls mit Betonung eines bestimmten, an sich unspezifischen, aber quantitativ besonders hervortretenden Merkmals — zu sprechen. Erst solche Syndrome haben — auch bei manchen Gemeinsamkeiten —

[1] Vergleichsuntersuchungen mit anders hergestellten Thymusextrakten sind in Angriff genommen.

differenzierenden und damit zuordnenden Wert — wie dies z. B. von Eger für Leber- und Milzextrakte gegenüber solchen aus Herz und Nieren und von mir für Thymusextrakte gegenüber solchen aus der Milz (noch unveröffentlicht) gezeigt werden konnte. Auf die therapeutische Indikation und Beurteilung wäre die gleiche Kritik (bezüglich Ovarialextrakte z. B. siehe Ratschow 1950) anzuwenden.

Ein wesentliches Kennzeichen des Thymussubstrates ist seine *antithyreoidale* Wirkung (vgl. auch schon Krizenecky u. Nevalonnyj 1927, 1929), welche Comsa (1949) zur biologischen Testung und zur Definition der Meerschweincheneinheit benutzt. Die vorliegenden Ergebnisse bestätigen die bisherigen Befunde auch bei Natrix.

So fanden schon Downs u. Eddy (1920) beim Kaninchen eine vermehrte Kolloidspeicherung nach Thymusextrakten; Schwarz (1940) beschrieb bei Fütterung von Amphibien mit frischem Thymus an den Schilddrüsen große Follikel, niedriges Drüsenepithel, spärliche Randvacuolen und geringe Durchblutung, „alles Symptome, die auf eine Hemmung der Kolloidabgabe in den Kreislauf hinweisen" (1940), S. 702. Kolloidspeicherung in der Drüse hat aber einen Mangel an Schilddrüsenhormon in der Peripherie zur Folge; dies wird unter anderem eindeutig durch die Metamorphose-Verzögerung bei Kaulquappen bewiesen (Romeis 1940). Verfütterung von Milz (Bomskov u. Brachat 1940, Schwarz 1940), Lymphknoten (Knipping 1923) und Tonsillen (Voss 1929, Griebel 1930, Hirata 1937) scheint zwar einen ähnlichen Einfluß auf die Schilddrüse auszuüben, jedoch sind die Effekte nach übereinstimmender Aussage aller Autoren wesentlich geringer (siehe auch Schwarz 1940) und eigene in dieser Richtung laufende Untersuchungen bestätigen dies bisher ebenfalls. Umgekehrt bewirkt Thymektomie beim Meerschweinchen Aktivierung der Schilddrüse sowie Auftreten eines thyreotropen Wirkstoffes im Urin (Comsa 1938, 1951).

Der Mechanismus dieser Abgabehemmung kann an verschiedenen Stellen ansetzen. Einmal wird eine Hemmung der Thyreotropinausschüttung diskutiert (Bomskov u. Sladowic 1940, Bomskov u. Spiegel 1940, Comsa 1956); hier fehlen jedoch bisher vor allem die histologischen Befunde an Hypophysenvorderlappen. Die in anderem Zusammenhang geführten Untersuchungen von Barrington u. Matty (1955) zur Identifizierung der thyreotropinbildenden (basophilen) Zellen in dem HVL bei Phoxinus brevis sowie die Arbeiten von Olivereau (1954), Teichmann-Duplessis und Mercrier-Parot (1955) Scharf u. Förster (1956 und früher) weisen aber einen Weg für weitere Untersuchungen zur Klärung dieser wichtigen Frage; über eigene diesbezügliche Befunde wird zu gegebener Zeit berichtet werden. Weiterhin ist eine Blockade des thyreotropen Hormons denkbar; nach Rawson (1949) setzt Thymus (aber auch Lymphknotengewebe) die Aktivität des thyreotropen Hormons im Explantat herab (vgl. auch v. Buddenbrock 1950). Schließlich muß eine Hemmung des Thyroxins selbst erwogen werden, denn nach Krizenecky 1926, Sklower 1926, Bomskov u. Kückes 1940, wird der Effekt einer Schilddrüsenfütterung durch gleichzeitige Thymusapplikation mehr oder weniger aufgehoben. Nach Comsa (1956) soll zunächst letztere Wirkung im Vordergrund stehen — die Schilddrüse wäre dabei also histologisch noch nicht wesentlich alteriert — und dann erst der antithyreotrope Effekt folgen.

Widersprechend erscheinen in diesem Zusammenhang jedoch zunächst die Befunde von Harms (1949, 1952), der das Bild der Stauungsschilddrüse gerade nach Thymektomie bei Amphibien beschreibt. Nähere Betrachtung weist jedoch auf einen wesentlichen Unterschied hin: Die außerordentliche Aktivität des Follikelepithels, das zum Teil zu wuchern beginnt, hochaktive Kernbilder zeigt und die Stimulierung parafollikulärer Zellen. Es bietet sich also hier ein den Basedowstrumen

vergleichbares Bild, welches Harms an eine Mehrausschüttung von thyreotropem Hormon denken läßt. Damit aber stellen auch die Befunde von Harms eine indirekte Bestätigung der antithyreoidalen Wirkung des Thymus dar.

Weiterhin scheint noch die außerordentlich häufige Häutung im Widerspruch zum antithyreoidalen Effekt zu stehen. Nach Eggert (1936) stagniert sowohl bei im Winterschlaf befindlichen Eidechsen mit stark inaktiver Schilddrüse wie auch bei thyreodektomierten Tieren die Häutung (vgl. auch schon Drzewicki 1928). An Schlangen löst aber — im Gegensatz zu den vorstehenden Befunden bei Lacertiden — die Thyreodektomie in verkürzten Abständen Häutungen aus, was nach Eggert (1936, S. 246) „zunächst nicht erklärt werden kann" (Schaefer 1933, Krockert 1941). (Vgl. hier jedoch die Vorbehalte von Halberkann 1953.) Andererseits läßt sich nach Halberkann die Häutungsbereitschaft der Ophidier durch Thyroxin oder durch Stimulierung der Schilddrüse mit Thyreotropin hemmen. Die beschleunigte Häutung paßt also bei den Ophidiern durchaus in den Rahmen des antithyreoidalen Effekts.

Die Fettspeicherungen im Mesenterialbereich und im Fettkörper oberhalb der Thyreoidea lassen sich — gemeinsam mit der von Pichotka beobachteten Basaltemperatursenkung extraktbehandelter Ratten — gut der antithyreoidalen Wirkung zuordnen. Sie wurde bei Ratten nach Thymusapplikation übrigens schon von Demel (1922), Schneider u. Nitschke (1930), Zondek u. Köhler (1930) u. a. beobachtet und vice versa wird z. B. bei Dystrophia adiposo-genitalis eine verminderte Thymusinvolution (siehe bei Tesseraux 1953) angeführt. Gleiches gilt für das Fettvorkommen in den Leberzellen als Zeichen herabgesetzter Oxydationsvorgänge. Für einen irreversiblen degenerativen Vorgang in der Leber besteht nämlich im Gesamtzellbild kein sicherer Anhalt; wieweit aus den anderen morphologischen Befunden (Chromatinveränderungen, randständiger Nucleolus, Kernmembranauflagerungen, Auftreten von Kernkugeln) auf ein abartiges Stoffwechselgeschehen, etwa in hypoxydotischer Richtung (vgl. die Arbeiten von Büchner und seiner Schule, ferner Schneppenheim u. Huhn 1955, Goslar u. Schneppenheim 1956) geschlossen werden kann, muß weiteren topochemischen Untersuchungen vorbehalten bleiben.

Zusammengefaßt lassen sich also eine Reihe vorliegender Beobachtungen in direkte Korrelation zum antithyreoidalen Effekt der Thymuswirkstoffe setzen und dieser Effekt kann damit für Ophidier bestätigt werden.

Die Aktivierung des *Inselapparates* des Pankreas steht zunächst im Widerspruch zu der Auffassung Bomskovs (1942) von einem Antagonismus von Thymus und Pankreas, bestätigt dagegen die Folgerungen von Sartori (1939) über eine synergistische Wirkung. Jedoch müssen hier auch hypophysäre und gonadenbedingte Einflüsse erwogen werden, (Oestrogene vergrößern ebenfalls den Inselapparat bei Schlangen, siehe Moscona 1955).

Eine weitere Position im Wirkungskomplex des Thymusextraktes stellt die *Aktivierung des Mesenchyms* dar. Dies ist jedoch zunächst als unspezifisch anzusehen, da ein großer Teil anderer Extrakte in gleicher

Weise agieren (vgl. die Ausführungen von Vorlaender 1956, S. 419 sowie von Tischendorf 1957). Ob solche Reaktionen auf eine zentrale Steuerung (Spigolon) zurückgeführt werden kann, muß gerade im Hinblick auf die vorgenannten Ausführungen zweifelhaft erscheinen; die Zahl der auf Mesenchymaktivierung geprüften, verschiedensten Substanzen ist so ungeheuer angewachsen und die Deutungsversuche — angefangen mit der direkten Beeinflussung der Zelle, über die Nebennieren bis zum Zwischenhirn-Hypophysensystem — so mannigfaltig, daß hierfür kaum noch eine gemeinsame Basis gefunden werden kann.

Eine auffällige Beobachtung am *Thymus* der Versuchstiere mag jedoch herausgegriffen werden. Hier zeigen sich nämlich die sogenannten „myoiden" Zellen immer stark vermehrt und vergrößert, während das lymphocytäre Gewebe im gleichen Maße zurückgedrängt wird. Das Bild ist gleichsam eine Steigerung des von Teichmann (1942) bei Thymi von Winterschlaftieren beschriebenen. Leider stand mir ein solches Vergleichsmaterial nicht zur Verfügung, da die Sommer und Winter unter gleichen Terrarienbedingungen gehaltenen Kontrolltiere keine wesentlichen jahreszeitlichen Schwankungen in der Histologie des Thymus aufweisen.

Zur Frage der sogenannten „myoiden" Zellen selbst, deren Genese und Deutung bei Teichmann (1940) ausführlich diskutiert wird, sei hier nur kurz Stellung genommen. Hammar (1905, 1936) und Teichmann (1942) fanden keine scharfen Grenzen zwischen Reticulumzellen und „myoiden" Zellen. Teichmann nimmt die Entstehung letzterer aus den entodermalen Reticulumzellen als sehr wahrscheinlich an. Die vorliegenden Befunde an Natrix liefern eine weitere Stütze für diese These, denn

a) zwischen typischen Reticulumzellen und den „myoiden" Zellen finden sich zahlreiche Übergangsformen,

b) die „myoiden" Zellen bilden an den Orten ihrer Anhäufung — vice versa — ein Netzwerk, während das Maschenwerk der Reticulumzellen hier verschwindet,

c) bei den „myoiden" Zellen werden nie Teilungsfiguren angetroffen, welche die rasche Vermehrung dieser Elemente aus bereits vorhandenen durch mitotische oder amitotische Teilung erklären könnte.

Unter diesen Umständen müssen also die sogenannten „myoiden" Zellen als eine Sonderform der Reticulumzellen angesehen werden, die durch bestimmte funktionelle Gegebenheiten bedingt ist. Ob sie sekretorische oder speichernde Funktion haben, kann aus den vorliegenden Befunden noch nicht abgeleitet werden; für eine phagocytierende Leistung jedoch lassen sich keinerlei Anhalte gewinnen.

Die vorliegenden Bilder sprechen für eine starke Umstimmung des Thymus nach der Extraktapplikation. Nach der obigen Stellungnahme über die Natur der „myoiden" Zellen kann dies im Rahmen der allgemeinen Mesenchymaktivierung gesehen werden; sekundär jedoch auch durch die Thyreostase bedingt sein, wie Beobachtungen über Hyperplasien anderer Schlundtaschen, z. B. der ultimobranchialen Körperchen nach Thyreodektomien an Lacertiden, zeigen (Drzewicki 1928, Plancher 1934, Sembrat u. Drzewicki 1936), die aber von Eggert (1937) bestritten werden. An Säugern liegen diesbezügliche so widersprechende Befunde vor, daß Bargmann (1943) in den Thymusveränderungen unter der

Wirkung des Inkretes der Schilddrüse „nicht die Verknüpfung des funktionellen Systems Thyreoidea-Thymus, sondern die Beantwortung von Eingriffen in den Stoffwechsel des Organismus" (S. 141) sehen will.

Zusammenfassend ist hinsichtlich des Thymus die immer wieder reproduzierbare Hyperplasie des Reticulum mit ungewöhnlicher Vermehrung der sogenannten „myoiden" Zellen und die Zurückdrängung des lymphatischen Anteiles zu verzeichnen. Korrelationen zu den entsprechenden Schilddrüsenbefunden sind denkbar, aber noch nicht gesichert.

Bei den *Milzbefunden*[1] lassen sich über eine allgemeine Aktivierung hinaus zunächst keine speziellen Aussagen machen. Sie sind zwar ein weiteres Glied in der Beweiskette für die Mesenchymstimulierung, andererseits aber völlig unspezifisch, wie Tischendorf (1957) bei entsprechenden Befunden mit Zwischenhirn-Lipoidextrakten darlegen konnte. Übereinstimmend mit diesem Autor soll auch hier die autochtone Genese der vermehrten eosinophil granulierten Zellen betont werden: Es handelt sich hierbei um histiocytäre Elemente, die unter Extrakteinfluß eine Funktionswandlung erfahren haben — wie die Befunde im Trabekelbereich lehren — und keineswegs etwa um eingewanderte eosinophile Leukocyten, wie man (für Zwischenhirn-Hypophysenextrakt) den Ausführungen Spigolons entnehmen könnte. Einmal müßte dem dann eine Eosinophilie des Blutbildes parallel gehen, wofür aber bei den Versuchstieren kein Anhalt besteht. Zum anderen spricht die Form der Zellen und die darin häufig aufzufindenden Kerntrümmer für eine Steigerung der jeglicher aktiver Bindegewebszelle innewohnenden Phagocytose-Eigenschaft.

Eine besondere Ansprechbarkeit unter den Bindegewebszellen zeigen die *Melanophoren*. Die Expansion dieser Zellen ist im Rückenhautbereich besonders ausgeprägt, während sie im Bauchhautgebiet zwar vorhanden (siehe Abbildung), aber makroskopisch nicht so deutlich in Erscheinung tritt. Ob es zusätzlich zu einer Melaninvermehrung in den betreffenden Zellen kommt oder gar eine Zunahme der Melanophorenzahl eintritt, vermag ich aus den vorliegenden Befunden noch nicht zu scheiden; letzteres halte ich jedoch für unwahrscheinlich, das ich in keinem Falle ent- eine *gestaltliche* Änderung — und wenn typische Merkmale wie Würfel oder Streifen vorhanden — der Rückenzeichnung nachweisen ließ. Romeis (1918, 1940) beschrieb sie bei der Kaulquappe, hebt aber bei ihrem Zustandekommen auch die äußeren Faktoren (z. B. Bodenbelag des Aquariums) hervor[2]. Schon Knipping (1923), Krizenecky u. Nevalonnyj (1927) betonten die pigmentsteigernde Wirkung des Thymus bei Sauropsiden, welche sie als echte Melaninvermehrung ansehen. Merkwürdig ist nur bei den Ergebnissen an Natrix — die übrigens auch mit den von Jöchle (1957) an Amphibien gewonnenen übereinstimmen (siehe Goslar 1957 b, c) — ihre zeitliche Begrenzung. Die meisten Versuchstiere hellen sich nach 6—8 Wochen wieder auf, bleiben aber auch dann immer noch etwas dunkler als die

[1] Vgl. hierzu auch die Beobachtungen von Grégoire und Duchateau (1956) an Lymphknoten.

[2] Die Dunklung der Tiere könnte übrigens auch durch Zunahme der Epidermis-Schichtdicke eintreten (vgl. Drzewicki 1928, S. 170 sowie v. Buddenbrock 1950, S. 49). Auf Grund der histologischen Befunde ist dies jedoch hier auszuschließen.

Grundfarbe betrug. Gleiche Effekte beobachtete Halberkann (1954) mit dem thyreotropen, adrenocorticotropen und somatotropen HVL-Hormonen nach anfänglich starker Dunkelung[1]. Bei ACTH geht die Aufhellung sogar über die Grundfarbe hinaus. Nach Thyroxingaben kam es dagegen von Anfang an zu Aufhellungen. Auch bei anderen Pigmenten (z. B. roten und gelben Lipochromen im Gefieder der Vögel) bewirkt dieses Hormon einen Ausfall (Driesen u. Völker 1953). Damit ist die antagonistische Wirkung zwischen Thymus- und Thyreoidea-Wirkstoffen hinsichtlich der Pigmentierung, wie er schon von Krizenecky u. Nevalonnyj herausgestellt wurde, erneut demonstriert. Andererseits teilt der Thymusextrakt diese Wirkung mit gut definierten Hypophysenvorderlappenhormonen. Wenn sich bei letzteren auch nicht absehen läßt, inwieweit hier Mittellappenwirkstoffe als Verunreinigungen eine Rolle spielen, so ist doch bei der Pigmentreaktion der Thymuswirkstoffe eine zentrale Steuerung wahrscheinlicher als eine periphere. Diese Frage läßt sich aber erst an hypophysektomierten Tieren bzw. durch einen Chromatophorentest im Sinne von Hogben u. Winton, Jores, Klippel u. König u. a. (s. Klippel u. König 1956) weiter klären.

Schließlich ist noch auf die Befunde an der *Epidermis* und auf den abartigen Verlauf des Häutungscyclus einzugehen. Ein Faktor bei Abweichungen des Häutungsverlaufes ist die Proliferationsgeschwindigkeit des Basalepithels (Goslar 1957 c). Sie ist bei den Thymustieren gesteigert, wie auch aus der Abbildung hervorgeht. Dies bedingt eine rasches Verschieben der Zellen in die höheren Lagen, was sich aus der Unregelmäßigkeit der Zellrichtung in der polygonalen und intermediären Zellschicht (betreffend Nomenklatur siehe die Ausführungen bei Goslar 1957 a) ersehen läßt, auch die relativ gute Erhaltung der Kernstruktur in den höheren Schichten spricht dafür. Andererseits ist die — im Gegensatz zu der Sexualhormonwirkung, beispielsweise (Goslar 1958) — Korrelation aller Schichten in allen Stadien nicht gestört. Welche *topochemischen* Veränderungen vorliegen, müssen weitere Untersuchungen entscheiden. Die Beeinflussung durch die Extraktapplikation greift also *nicht* in den inneren Ablauf des Häutungsgeschehens im epithelialen Bereich ein. Der völlig gleiche Verlauf der Häutungsphase selbst (also von der beginnenden Bauchtrübung bis zum Abstreifen der alten Haut) und die Konstanz der einzelnen Teilgeschehnisse dieser Periode bei Versuchs- und Kontrolltier bestätigt diese aus der Morphologie gezogene Folgerung ebenfalls.

Demgegenüber fand Drzewicki (1928) an thyreodektomierten Eidechsen tiefgreifende morphologische Änderungen im inneren Aufbau der Epidermis (massive Verdickung der lockeren Hornschicht, fehlende Ausbildung einer Grenzschicht). Auf diesen Befund sei aus folgednem Grund besonders hingewiesen: Eingangs wurden die widersprechenden Befunde hinsichtlich der Zusammenhänge zwischen Schilddrüse und Häutungsverlauf referiert (Eggert, Schaefer, Halberkann, Befunde bei Winterschlaf, Thyreodektomie, Thyreostatica, Thyreotropin, Thyroxin).

[1] Auch beim Menschen wird nach ACTH-Applikation eine Pigmentierungszunahme beschrieben (Hijmans, Dissert. Leiden 1952, Bastenie, Conard u. Franckson 1953) wie umgekehrt Cortison als hypophysenhemmendes Prinzip Verringerung der Pigmentierung bewirkt (Bastenie, ferner Simpson 1955, Halberkann 1954).

Die Einbeziehung der eigenen Befunde führt damit aber zu dem Schluß, daß die Wirkungsweise einer Thyreodektomie nicht derjenigen einer durch chemische oder hormonelle Thyreostatica bedingten Bremsung des Organs gleichgesetzt werden darf.

Die zentrale Rolle der Schilddrüse bei den Häutungsvorgängen wird zwar auch durch die vorliegenden Ergebnisse demonstriert; die Befunde mahnen aber doch zur Vorsicht gegenüber einer die Korrelationen allzu vereinfachenden Entweder-Oder-Hypothese. Zwischen Bremsung und Ausschaltung des Organs existieren noch mannigfaltige Wirkungsunterschiede, welche weiterhin einer subtilen Differenzierung durch ausgedehnte Versuchsreihen bedürfen.

Schließlich sei noch auf einen interessanten blutchemischen Befund nach Thymusapplikation hingewiesen. Nitschke (1929, 1930) isolierte aus Kalbsthymi eine den Calcium- und Phosphorblutspiegel senkende Substanz und will mit deren Applikation tetanische Symptome ausgelöst haben. Schon Uhlenhuth (1919) hatte gleiches an Amblystomalarven nach Verfütterung von Kalbsthymus beobachtet, während es ihm an bereits metamorphorierten Tieren niemals gelang (siehe auch v. Buddenbrock 1950, S. 218). Bei meinen Versuchstieren habe ich tetanische Symptome — selbst bei hohen Applikationen — nie beobachtet.

Überblickt man die Vielfalt der Befunde, dann wird man noch keine Berechtigung für den Versuch einer alle Einzelheiten zusammenfassenden Hypothese für die Wirkung des Extraktes aus aktiviertem Thymi als gegeben ansehen. Die bisher nicht beschriebene Kombination des Verhaltens der verschiedenen Organe, insbesondere von Schilddrüse, Thymus und Haut läßt jedoch die Charakterisierung als eines bisher nur von diesen Wirkstoffen erreichbaren Syndroms zu.

Zusammenfassung

Es wird über den Einfluß eines Extraktes aus aktiviertem Thymus auf den Häutungsverlauf und das histologische Verhalten einiger Organe von Natrix natrix L. berichtet.

1. Das häutungsfreie Intervall der Tiere wird kurze Zeit nach dem Beginn der Applikation bis auf die Hälfte und darunter verkürzt. Diese Verkürzung hält über mehrere Cyclen an, mindert sich jedoch später etwas.

2. Der Ablauf der Häutungsphase (= Beginn der Bauchtrübung bis Abstreifen der Haut) bleibt zeitlich unverändert.

3. Histologisch findet sich eine starke Proliferation der Basalzellschicht; Korrelation der einzelnen Epidermislagen, Verhornung und Grenzschichtbildung ist nicht gestört.

4. Nach 2—3 Wochen erfolgt eine starke Dunklung der Tiere, welche nach 6—8 Wochen langsam wieder zurückgeht; die Grundfarbe wird jedoch nicht mehr erreicht.

5. Das Follikelepithel der Schilddrüse ist signifikant erniedrigt, das Kolloid gestaut und zähflüssig (Stauungsschilddrüse).

6. In den Thymi erfolgt eine starke Vermehrung der sogenannten „myoiden" Zellen, Reticulumzellen und lymphatisches Gewebe dagegen sind zurückgedrängt. Die Ergebnisse sprechen für die von Hammar (1909) und von Teichmann (1942) vermutete Entstehung der „myoiden" Zellen aus den Reticulumzellen durch bestimmte funktionelle Bedingungen.

7. Der Fettkörper der Tiere über der Thyreoidea ist stark vergrößert, das Fettgewebe im Mesenterium ist vermehrt.

8. Die Leberzellen zeigen eine mittel- bis grobtropfige Verfettung; Anzeichen einer Degeneration wurden jedoch sonst nicht gefunden.

9. In der Milz erfolgt eine starke Aktivierung der mesenchymalen Elemente; besonders auffällig ist die Zunahme der eosinophil granulierten Histiocyten.

10. Der Inselapparat des Pankreas ist vergrößert.

11. Die bisherigen Versuche, die Beziehung der Schilddrüse zum Häutungsablauf zu deuten, wurden mit den sich aus der Literatur ergebenden Widersprüchen dargestellt.

Literatur

Adams, E., A. Kuder and L. Richards: J. of exper. Zool. **63**, 1 (1932).

Adams, E., and L. Richards: Anat. Rec. **44**, 222 (1929).

Adams, E., L. Richards and A. Kuder: Science (Lancaster, Pa.) **72**, 78 (1930).

Altmann, H. W.: Klin. Wschr. **1955**, 306.

Bargmann, W.: Der Thymus. In Hdb. d. mikroskop. Anat. d. Menschen. Bd. VI/4, 1, 1943.

Bastenie, P. A., V. Conard et J. R. M. Franckson: Presse méd. **1953**, 263.

Bemmelen, van J.: zitiert nach Pischinger.

Berg, W.: Z. mikroskop.-anat. Forsch. **35**, 146 (1934).

Bolau, H.: Zoolog. Jb. (A) **12**, 1899.

Bomskov, Chr.: Klin. Wschr. **1942**, 162.

Bomskov, Chr., u. F. Brachat: Endocrinology (Springfield, Ill.) **23**, 145 (1940).

Bomskov, Chr., u. G. Kückes: Pflügers Arch. **244**, 246 (1940).

Bomskov, Chr., u. L. Sladowic: Dtsch. med. Wschr. **1940**, 589.

Bomskov, Chr., and E. Spiegel: Endocrinology (Springfield, Ill.) **23**, 253 (1940).

Barrington, E. J., and A. J. Matty: Quart. J. Microsc. Sci. **96**, 193 (1955).

Buddenbrock, von W.: Vergl. Physiologie der Wirbeltiere, IV. Hormone. Basel: Birkhäuser 1950.

Comsa, J.: C. r. Soc. Biol. (Paris) **127**, 903 (1938). — Ann. d'Endocrin. **10**, 378, (1949). — C. r. Acad. Sci. (Paris) **228**, 2061 (1949); **230**, 2337 (1950); **232**, 1245 (1951). — Experientia (Basel) **8**, 267 (1952). — Amer. J. Physiol. **170**, 528 (1952). — Acta Endocrinol. **19**, 406 (1955). — Ann. Universitatis Saraviensis (med.) **4**, 213 (1956). — C. r. Acad. Sci (Paris) **242**, 1513 (1956).

Curri, S. B., e S. Fedeli: Endocrinologia (Bologna) **16**, 529 (1955). — Boll. Soc. ital. Biol. sper. **31**, 255 (1955). — Riv. Anat. Pat. XI, 4 (1956).

Demel, R.: Mitt. Grenzgeb. Med. u. Chir. **34**, 437 (1922).

Downs, A. W., and N. B. Eddy: Endocrinology (Springfield, Ill.) 4, 420 (1920).

Driesen H. H., u. O. Völker: Naturwissenschaften **40**, 61 (1953).

Drzewicki, St.: C. r. Soc. Biol. (Paris) **90**, 1364 (1924). — Arch. Entw. mech. **114**, 155 (1928).

Ecke, A. von: zit. nach Hammar 1909.

Eger, W.: Münch. med. Wschr. **1956**, 73.
Eggert, B.: Zool. Anz. **105**, 1 (1933). — Z. Zool. (A) **147**, 205 (1935); **147**, 537 (1936); **148**, 221 (1936); **149**, 280 (1937).
Fedeli, S., S. B. Curri e S. Tambuscio: Arch. Sci. med. **80**, 1 (1955).
Ferner, H.: Persönliche Mitteilung.
Goslar, H. G.: Acta Histochem. 1957a (im Druck). — Arzneimittel-Forsch. **7**, 399 (1957b). — Diskussionsbemerk. z. Vortrag Jöchle; V. Symposion Dtsch. Endokr. Ges. Freiburg, März 1957c. — Dermat. Wschr. 1958, Heft 6 (im Druck).
Goslar, H. G., u. P. Schneppenheim: Beitr. path. Anat. **116**, 517 (1956).
Grégoire, Ch., u. Gh. Duchateau: Arch. de Biol. **67**, 269 (1956).
Griebel, C.: Arch. Ohrenheilk. **24**, 248 (1930).
Gros, H., u. E. Kirnberger: Klin. Wschr. **1954**, 590.
Halberkann, J.: Naturwissenschaften **39**, 573 (1952); **41**, 237 (1953). — Arch. Dermat. **97**, 37 (1953). — Naturforsch. **9b**, 77 (1954).
Hammar, J. A.: Anat. Anz. **27**, 41 (1905). — Erg. Anat. **19**, 1 (1909). — Die normalmorphologische Thymusforschung im letzten Vierteljahrhundert. Analyse und Synthese. Leipzig 1936.
Harms, J. W.: Verh. dtsch. Zool. Ges. **42**, 232 (1949). — Morphol. Jb., Leipzig **92**, 256 (1952).
Hartmann, A.: Die Milz, in v. Möllendorffs Hdb. d. mikrosk. Anat. d. Menschen VI **1**, 397 (1930).
Hirata, Y.: Okayama-Igahkai Zass-hi (dtsch. Zusammenfassung) **49**, 512 (1937).
Hoepke, H.: Mikroskopie (Wien) **10**, 268 (1955).
Hoffmann, C. K.: zit. nach Hartmann, A. (1930).
Houssay, B. A.: Brit. Med. J. **1951**, 505.
Hoyer, H.: Inaug. Diss. Straßburg 1892.
Jaeger, K. H., u. H. Mittenzwei: Klin. Wschr. (im Druck). — Persönliche Mitteilung.
Jöchle, W.: Vortrag V. Symposion Dtsch. Ges. f. Endokrin. Freiburg, März 1957.
Jores, A.: Klinische Endokrinologie. Berlin, Göttingen, Heidelberg: Springer 1949.
Klein, E.: Dtsch. med. Wschr. **1956**, 714.
Klippel, R., u. J. König: Arzneimittel-Forsch. **6**, 489 (1956).
Knipping, H. W.: Klin. Med. (Wien) **141**, 224 (1923).
Knipping, H. W., u. W. Rieder: Z. exper. Med. **42**, 374 (1924).
Knödgen, H.: Med. Klin. **1952**, 1211; **1953**, 1105, 1211.
Kopf, R., A. Loeser u. G. Meyer: Dtsch. med. Wschr. **1948**, 512.
Krizenecky, J.: Arch. Entw. mechan. **107**, 583 (1926).
Krizenecky, J., u. M. Nevalonnyj: Arch. Entw. mechan. **112**, 594 (1927); **115**, 876 (1929).
Krockert, G.: Vitamine u. Horm., Leipzig **1**, 23 (1941).
Maurer, F.: Verh. Anat. Ges. **1898**, 256.
Maurer, F.: Morphol. Jb. **27**, 119 (1899).
Mayer, S.: Anat. Anz. **3**, 97 (1888).
Moscona, A.: Bull. Res. Council of Israel **3**, 253 (1954).
Nitschke, A.: Z. exper. Med. **65**, 637 (1929). — Klin. Wschr. **1929**, 8. — Mschr. Kinderheilk. **47**, 530 (1930).
Oliveraux, M.: Ann. Appl. Biol. **30**, 63 (1954).
Ottaviani, G., u. G. Azzali: Acta neuroveget., Wien **13**, 1 (1955).
Pearse, A. G. E.: Histochemistry, Theoretical and Applied. London 1954.
Pichotka, J.: persönliche Mitteilung.
Pischinger, A.: Kiemenanlagen und ihre Schicksale bei Amnioten, 2c: Thymus. In Bolk, Göppert, Kallius, Lubosch, Hdb. d. vergleich. Anat. d. Wirbeltiere, Bd. III, 307, 1937.

Plancher, C.: Monit. zool. ital. **45**, 52 (1934).
Rao, M. A.: Proceed. Nat. Inst. Sci. India, Part B **21**, 10 (1955).
Ratschow, M.: Med. Welt **1950**, 40.
Rawson, R. W.: Ann. New York Acad. Sci **50**, 491 (1949).
Romeis, B.: Arch. Entw. mechan. **104**, 273 (1925); **140**, 646 (1940).
Sartori, E.: Boll. Soc. ital. Biol. sper. **14**, 323 (1939).
Schaefer, W. H.: Proc. Soc. Exper. Biol. a. Med. **30**, 1363 (1933).
Scharf, J. H., u. W. Förster: Photographie u. Forschung **7**, 116 (1956).
Schiller, E.: Z. mikrosk.-anat. Forsch. **54**, 589 (1944). — Anat. Anz. **96**, 413 (1948a). — Dtsch. med. Wschr. **1948**b, 573. — Z. Zellforsch. **34**, 337 (1949).
Schneider, M., u. A. Nitschke: Klin. Wschr. **1930**, 1489.
Schneppenheim, P., u. A. Huhn: Beitr. path. Anat. **115**, 119 (1955).
Schwarz, E.: Arch. Entw. mechan. **140**, 711 (1940).
Simpson, S. A.: Ciba Found. Coll. on Endocr. Vol VIII, 239 (1955).
Sklower, A.: Verh. dtsch. Zool. Ges. **1926**, 177. — Z. vergl. Physiol. **2**, 6 (1925).
Spigolon, G.: Atti Soc. lombarda Sci. med. e biol. X/**2**, 1 (1955).
Stümpke, G.: Hautkrankheiten u. endokrin. System, Berlin 1934.
Szent-Györgyi, A.: Bioenergetics, Chapt. 18 on the Thymus. New York: Acad. press 1957.
Teichmann, W.: Z. Zellforsch. **30**, 689 (1940); **32**, 194 (1942).
Teichmann-Duplessis, H. u. L., Mercrier-Parot: C. r. Assoc. Anat. **86**, 721 (1955).
Tesseraux, H.: Physiol. u. Patholog. d. Thymus (Band 9 der zwanglosen Abhandlungen aus dem Gebiete der inneren Sekretion), Leipzig 1953.
Tischendorf, Fr.: Acta neurovegetativa (Wien) 1957 (im Druck). — Riv, di Anat., Patol. e Oncolog. **13**, 128 (1957).
Uhlenhuth, E.: J. Gen. Physiol. **1**, 23 (1919).
Vorlaender, K. O.: Der Wirkungsmechanismus der parenteralen Gewebe- u. Reizkörpertherapie, in: Ergebnisse der med. Grundlagenforschung. Hrsg. K. Fr. Bauer. Stuttgart: Thieme 1956.
Voss, O.: Arch. Dtsch. Heilk. **21**, 1 (1929).
Wilson, A., and H. Wilson: Amer. J. Med. **19**, 697 (1955).
Zondek, H., u. G. Köhler: Bethe-Bergmanns Hdb. norm. u. path. Physiol. II/I 692: XVI/I 656, 1930.

Dr. med. Hans Günter Goslar,
Anatomisches Laboratorium der Universitäts-Haut-Klinik, Köln-Lindenthal

Arch. exper. Path. u. Pharmakol., Bd. 233, S. 226—232 (1958)

Aus dem Institut für experimentelle Pathologie der medizinischen Fakultät der Karls-Universität in Prag, Pilsen (Vorstand: Doz. Dr. Jan Hrbek)

Der Einfluß des Chlorpromazins auf den Stoffwechsel von Stickstoff und Eiweiß

Von

T. Braun, Z. Chaloupka und J. Neuwirt

Mit 2 Textabbildungen

(Eingegangen am 1. September 1957)

Nach chronischer Verabreichung von Chlorpromazin beobachteten wir bei Kaninchen eine Gewichtsabnahme und bei jungen Ratten eine Verlangsamung des Wachstums. Ähnliche Beobachtungen machte Laborit, der außer Gewichtsabnahme bei Versuchstieren auch das Auftreten von Decubitus bei chronischer Verabreichung von Chlorpromazin beschreibt. Auf Grund dieser Beobachtungen gelangte Laborit zu der Ansicht, daß Chlorpromazin in den intermediären Stoffwechsel eingreift.

In der Literatur über den Einfluß des Chlorpromazins auf Stoffwechselvorgänge sind viele Unklarheiten, und zahlreiche Angaben widersprechen einander. Besonders wenig Aufmerksamkeit wurde bisher dem Einfluß des Chlorpromazins auf den Stickstoff- und Eiweißstoffwechsel gewidmet. Unsere Beobachtungen und Befunde einiger Autoren geben davon Zeugnis, daß Chlorpromazin zu Veränderungen im Stickstoff- und Eiweißmetabolismus führt. Wir entschlossen uns daher, diese Veränderungen systematisch zu verfolgen und einer näheren Analyse zu unterziehen.

Methodik

15 ausgewachsene Kaninchen im Gewicht von 3—4 kg teilten wir in 4 Gruppen:

Der ersten Gruppe von 3 Kaninchen verabreichten wir 2 mg/kg Chlorpromazin und verfolgten die Stickstoffbilanz eine Woche lang.

Die zweite Gruppe enthielt 3 Kaninchen, welchen wir 5 mg/kg Chlorpromazin täglich verabreichten. Auch bei dieser Gruppe verfolgten wir die Stickstoffbilanz im Verlauf einer Woche.

In der dritten Gruppe waren 6 Kaninchen, welche täglich 6 mg/kg Chlorpromazin erhielten. Die Bestimmung der Stickstoffbilanz nahmen wir hier durch drei Wochen vor.

In der vierten Gruppe waren 3 Kaninchen, die wir paarweise mit der zweiten Gruppe fütterten. Bei dieser Gruppe verfolgten wir nur das Körpergewicht.

Bei den Kaninchen der dritten Gruppe verfolgten wir außer der Stickstoffbilanz auch den Eiweißgehalt im Plasma, die elektrophoretischen Veränderungen, die Kreatininausscheidung im Harn und die Diurese innerhalb von 24 Std.

Den Kaninchen verabreichten wir die Nahrung uneingeschränkt. Die einzelnen Ernährungsbestandteile waren in folgendem Verhältnis vertreten: 81,5% Kohlenhydrate, 12,4% Eiweiß und 6,1% Fette. Vitamine und Salze waren in dieser Ernährung in ausreichenden Mengen vertreten. Mit dieser Ernährung begannen wir 14 Tage vor Verabreichung von Chlorpromazin.

Die Tiere verteilten wir einzeln in Stoffwechsel-Käfige. Nach mehrtägiger Eingewöhnung begannen wir eine Woche vor der Chlorpromazinverabreichung mit der Bestimmung von Stickstoff im Harn, Stuhl und Nahrungsproben. Den Stickstoff bestimmten wir nach der Methode von KJEHLDAHL, den Bluteiweißgehalt refraktometrisch mit dem Refraktometer ABBES und die Eiweißfraktionen mittels Papierelektrophorese in feuchter Kammer bei Verwendung von Veronal-Oxalat-Citrat-Puffer (p_H 8,5). Den Kreatiningehalt im Harn stellten wir mittels modifizierter Methode von Folin (HOŘEJŠÍ) fest. Das Chlorpromazin (Largactil Specia) wurde einmal täglich i. m. injiziert, die Kontrollgruppe erhielt die gleiche Menge physiologischer Kochsalzlösung.

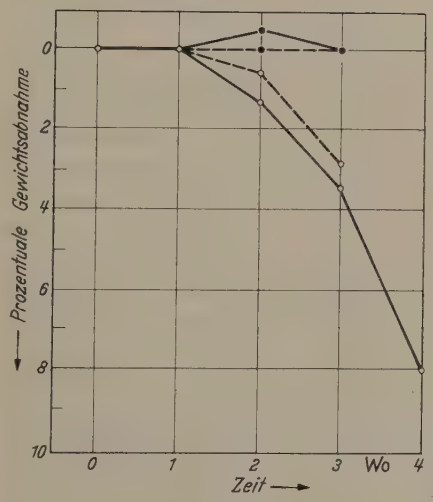


Abb. 1

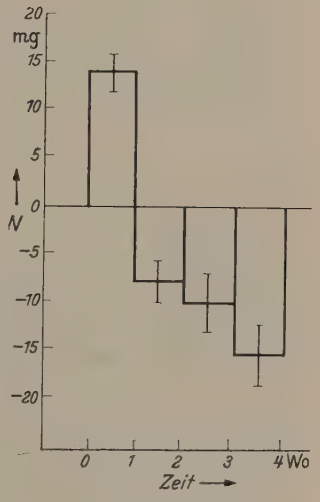


Abb. 2

Abb. 1. Wirkung von Chlorpromazin auf das Körpergewicht. o———o Periode vor der Chlorpromazinverabreichung; •———• Kontrollgruppe; •— — —• Gruppe mit Chlorpromazindosis von 2 mg/kg Gewicht; o— — —o Gruppe mit Chlorpromazindosis von 5 mg/kg Gewicht; o———o Gruppe mit Chlorpromazindosis von 5 mg/kg

Abb. 2. Stickstoffbilanz bei Kaninchen mit einer Chlorpromazindosis von 6 mg/kg Gewicht. Die senkrechte Spalte veranschaulicht die Stickstoffbilanz in einzelnen Wochen. Die Werte des Stickstoffes sind auf 100 g Körpergewicht berechnet

Ergebnisse

1. Die Gewichtsveränderungen sind in der Abb. 1 wiedergegeben. Gewichtsabnahme tritt sowohl bei der zweiten Gruppe der Kaninchen (5 mg/kg Gewicht) als bei den Kaninchen der dritten Gruppe (6 mg/kg Gewicht) ein. Das Gewicht veränderte sich hingegen nicht bei Kaninchen, welche 2 mg/kg Gewicht erhielten. Ebenso trat keine Gewichtsveränderung bei der Kontrollgruppe ein, die wir paarweise ernährten.

Tabelle 1

		Anzahl der Tiere	Stickstoffaufnahme in mg/100 g Körpergewicht/24 Std		P^*	Stickstoffausscheidung im Harn in mg/100 g Körpergewicht/24 Std		P^*	Stickstoffausscheidung im Stuhl in mg/100 g Körpergewicht/24 Std		P^*	Stickstoffausscheidung in Harn und Stuhl in mg/100 g Körpergewicht/24 Std		P^*
			M	σ		M	σ		M	σ		M	σ	
vor Chlorpromazinverabreichung		6	30,67	6,04	—	10,85	2,33	—	6,20	2,88	—	17,05	3,15	—
nach Chlorpromazinverabreichung	1. Woche	6	23,97	6,30	unsignif.	21,28	4,04	$< 0{,}001$	10,84	4,77	unsignif.	32,12	5,19	$< 0{,}001$
	2. Woche	6	24,84	3,28	unsignif.	25,92	6,36	$< 0{,}001$	9,25	3,55	unsignif.	35,18	6,88	$< 0{,}001$
	3. Woche	6	22,66	2,57	$< 0{,}05$	29,73	7,62	$< 0{,}001$	8,73	3,54	unsignif.	38,46	9,25	$< 0{,}001$

M Durchschnittswerte gewonnen durch Messung der Kaninchen im Laufe einer Woche; σ Standardabweichung; P^* statistische Signifikanz des Durchschnittsunterschiedes (gegenüber der Periode vor der Chlorpromazinverabreichung).

Tabelle 2. *Elektrophoretische Veränderungen der Eiweißfraktionen.* Durchschnittswerte aus den Ergebnissen bei 6 Kaninchen

		Anzahl der Tiere	Gesamteiweiß g-%		Albumin rel.-%		Globuline rel.-%							
							alpha-1		alpha-2		beta		gamma	
			M	σ	M	σ	M	σ	M	σ	M	σ	M	σ
vor Chlorpromazinverabreichung		6	7,01 6,45	0,41 0,44	59,39 57,88	4,51 5,20	7,53 8,78	1,27 1,48	6,97 6,91	1,57 0,85	10,23 10,10	2,12 2,89	15,79 16,36	2,58 3,03
nach Chlorpromazinverabreichung	1. Woche	6	7,13 7,00	0,35 0,48	52,35 52,40	3,14 2,42	9,67 10,88	2,98 2,56	8,23 7,41	0,82 0,43	9,77 11,92	2,52 2,01	19,95 18,07	2,67 4,22
	2. Woche	6	7,03 6,34	0,49 0,47	43,03 40,60	4,31 3,72	11,72 11,86	1,80 1,99	6,99 7,10	1,74 1,72	15,76 14,51	3,03 4,83	22,05 25,78	4,67 4,55
	3. Woche	6	7,43	0,59	39,72	2,38	12,21	1,89	8,59	2,04	14,41	2,66	24,90	2,74

2. Stickstoffbilanz. Vor Verabreichung von Chlorpromazin ist die Stickstoffbilanz bei allen Kaninchen positiv. Am zweiten Tag nach Verabreichung von 6 mg/kg Chlorpromazin wird die Stickstoffbilanz negativ bei allen Kaninchen und bleibt so innerhalb von 3 Wochen (Abb. 2). Eine genauere Analyse der Stickstoffaufnahme und Stickstoffabgabe zeigt die Tab. 1. Aus derselben ist ersichtlich, daß die Stickstoffaufnahme durch die Nahrung bei der Dosis von 6 mg/kg Gewicht um ungefähr 20% sinkt. Dieser Rückgang wird erst in der dritten Woche des Versuchszeitraums signifikant. Erhöhte Stickstoffausscheidung tritt vor allem im Harn ein. In der ersten Woche der Chlorpromazinverabreichung steigt der Stickstoffgehalt im Harn um 96% ($P < 0{,}001$), in der zweiten um 138% ($P < 0{,}001$) und in der dritten um 173% ($P < 0{,}001$).

Der Stickstoff im Kot zeigt eine Steigerung, besonders in der ersten Woche der Chlorpromazinverabreichung. Diese Steigerung ist jedoch weder in der ersten noch in den weiteren Wochen statistisch signifikant.

Bei den Kaninchen der ersten und zweiten Gruppe (Dosis 2 mg und 5 mg/kg) kommt es nach Chlorpromazin auch zur erhöhten Ausscheidung von Stickstoff. Der einzige Unterschied zwischen beiden Gruppen besteht darin, daß bei den Kaninchen mit der Dosis von 2 mg/kg es nur zu einer Depression der Stickstoffretention im Organismus kommt, wogegen die Kaninchen mit einer Dosis von 5 mg/kg durchwegs eine negative Stickstoffbilanz aufweisen. Kaninchen mit einer Dosis von 2 mg/kg scheiden in der Woche vor der Chlorpromazinverabreichung 20,21 $\pm$ 0,76 mg N/100 g Gewicht innerhalb 24 Std aus. In der Woche nach der Chlorpromazinverabreichung betrug die Stickstoffausscheidung 33,54 $\pm$ 0,97 mg N/100 g Gewicht ($P < 0{,}001$). Die Depression der Stickstoffretention im Organismus stellte sich hier ein (18,45 $\pm$ 2,88 mg N/100 g in der Woche vor der Chlorpromazinverabreichung bzw. 6,31 $\pm$ 2,11 mg N/100 g in der Woche nach Chlorpromazinverabreichung; $P < 0{,}01$), obwohl die Stickstoffaufnahme durch die Nahrung sich bei dieser Gruppe nicht ändert, (38,68 $\pm$ 2,68 mg N/100 g vor der Chlorpromazinverabreichung und 39,85 $\pm$ 3,6 mg N/100 g in der Woche nach der Chlorpromazinverabreichung).

3. Die Werte der gesamten Plasma-Eiweiße und die elektrophoretischen Veränderungen der Eiweißfraktionen zeigt Tab. 2. Der Gehalt der Plasma-Eiweiße zeigt im Laufe der dreiwöchigen Chlorpromazinverabreichung keine größeren Veränderungen. Die Eiweißfraktionen weisen eine relative Abnahme von Albuminen und eine Erhöhung der Globulinfraktionen auf, mit Ausnahme von α-Globulin, dessen Werte sich nicht signifikant ändern.

4. Kreatinin. Die Veränderungen in der Kreatininausscheidung im Harn innerhalb von 24 Std sind in der Tab. 3 veranschaulicht. Zur erhöhten Kreatininausscheidung gelangt es bei der Dosis von 6 mg/kg

insbesondere in der dritten Woche der Chlorpromazinverabreichung. Die Erhöhung beträgt 25%, ist jedoch nicht signifikant.

5. Diurese. Bei fortlaufender Aufzeichnung beobachteten wir in der zweiten Hälfte des Versuchszeitraums eine beträchtliche Erhöhung der

Tabelle 3. *Veränderungen der Kreatininausscheidung im Harn*

		Anzahl der Tiere	Harnkreatin in mg/24 Std		P^*
			M	σ	
vor Chlorpromazinverabreichung		6	127,25	18,38	—
nach Chlorchromazinverabreichung	1. Woche	6	145,31	31,57	unsignifikant
	2. Woche	6	144,46	17,50	unsignifikant
	3. Woche	6	156,60	31,72	unsignifikant

P^* statistische Signifikation des Durchschnittunterschiedes (gegenüber der Periode vor der Chlorpromazinverabreichung)

Tabelle 4. *Einfluß von Chlorpromazin auf die Diurese*

		Anzahl der Tiere	Harnmenge in ml/24 Std		P^*
			M	σ	
vor Chlorpromazinverabreichung		6	103,73	30,97	—
nach Chlorpromazinverabreichung	1. Woche	6	126,38	44,62	unsignifikant
	2. Woche	6	174,08	49,66	$< 0{,}05$
	3. Woche	6	191,40	79,80	$< 0{,}05$

Diurese bei der Mehrzahl der Kaninchen. Die Diureseerhöhung ist ungeachtet individueller Unterschiede in der zweiten und dritten Woche signifikant, wie die Tab. 4 zeigt. In der zweiten Woche beträgt sie 68% ($P < 0{,}05$), in der dritten Woche 84% ($P < 0{,}05$).

Diskussion

Aus den Ergebnissen ist ersichtlich, daß Chlorpromazin in höheren Dosen bei Kaninchen zu Gewichtsabnahme und negativer Stickstoffbilanz führt, bei niedrigen Dosen nur die Stickstoffausscheidung erhöht. Die negative Stickstoffbilanz können wir nicht durch niedrigere Stickstoffaufnahme in der Ernährung erklären. Das beweisen die Ergebnisse bei der Kontrollgruppe, bei welcher die Nahrungsaufnahme auf die Werte begrenzt wurde, welche die Kaninchen mit Chlorpromazin erhielten, und bei der es trotzdem zu keinen Veränderungen im Körpergewicht kam.

Außerdem zeigt sich eine erhöhte Stickstoffausscheidung auch bei Kaninchen mit niedrigeren Chlorpromazindosen, wo sich die Nahrungsaufnahme nicht veränderte. Die erhöhte Stickstoffausscheidung aus dem Organismus tritt einerseits im Kot, andererseits im Harn in Erscheinung. Im Kot war die Erhöhung an Stickstoff nicht signifikant, im Harn jedoch war die erhöhte Sticktsoffkonzentration beträchtlich.

Die Veränderungen im elektrophoretischen Spektrum der Eiweißfraktionen der Versuchskaninchen stimmen im großen ganzen mit den Feststellungen anderer Autoren (Lapteva, Lehmann u. Hanrahan) überein, welche außer Veränderungen des Albumin-Globulin Quotienten häufig eine Erhöhung der Sedimentationsgeschwindigkeit feststellten. Unsere Feststellungen haben gezeigt, daß sich bei Kaninchen unter einer täglichen Chlorpromazindose von 6 mg/kg die Diurese in der zweiten Hälfte des Versuchszeitraums erhöht. Das stimmt mit dem Befund Moyers überein, der bei Hunden nach Chlorpromazin eine Diureseerhöhung vorfand. Demgegenüber haben Kovács, Dasgupta u. Häusler festgestellt, daß Chlorpromazin allein die Diurese nicht beeinflußt, aber die antidiuretische Wirkung von Nicotin potenziert. Den Einfluß von Chlorpromazin auf die Diurese können wir vorläufig nicht erklären. Es ist möglich, daß Chlorpromazin in größeren Dosen irgendwelche endokrine Reaktionen beeinflußt.

Der *Mechanismus* der Wirkung des Chlorpromazins auf den Stickstoff- und Eiweißstoffwechsel bleibt vorläufig unklar. Laborit erklärt die Abmagerung der Versuchstiere und das fallweise Auftreten von Decubitus bei Patienten bei künstlicher Hibernation durch Beschränkung des Zuckerstoffwechsels und dadurch, daß der Organismus dann gezwungen ist, sich mehr auf die energetische Ausnützung von Fetten und Eiweiß umzustellen. Die Einschränkung des Zuckerstoffwechsels nach Chlorpromazin ist vorläufig nicht sicher nachgewiesen worden; unsere Ergebnisse stehen jedoch in Übereinstimmung mit der Behauptung Laborits.

Laborit führt allerdings gleichzeitig die Ergebnisse Borios an, welcher feststellte, daß künstlich hibernisierte Tiere zwar an Gewicht verlieren, aber daß die Harnstoffbildung bei ihnen normal oder sogar verringert ist. Interessant sind in diesem Zusammenhang auch die Ergebnisse Skuins, welcher nach Chlorpromazin bei seinen Patienten eine erhöhte Ausscheidung von Aminostickstoff im Harn beobachtete.

Wir nehmen an, daß die erhöhte Ausscheidung von stickstoffhaltigen Stoffen mit einer Störung der Desaminierung in der Leber oder in der Niere zusammenhängt. Für eine gewisse Störung des Leberparenchyms sprechen indirekt die Veränderungen im elektrophoretischen Spektrum der Eiweißfraktionen, die Veränderungen im Albumin-Globulin-Quotienten und die häufige Erhöhung der Sedimentationsgeschwindigkeit (Lehmann u. Hanrahan).

Es bleibt die Frage offen, in welchem Ausmaße sich bei der Ausscheidung von stickstoffhaltigen Stoffen ACTH und die Hormone der Nebennierenrinde geltend machen, deren erhöhte Sekretion von einigen Autoren nach Chlorpromazin beschrieben wurde (Georges, Vogt, Holzbauer).

Zusammenfassung

1. Chlorpromazin in täglichen Dosen von 2 mg/kg Gewicht verringert die Retention von Stickstoff im Organismus.

2. Chlorpromazin in größeren Dosen führt bei Kaninchen zu erhöhter Ausscheidung von stickstoffhaltigen Stoffen, zur negativen Stickstoffbilanz und zum Absinken des Körpergewichtes.

3. Auf Grund unserer Ergebnisse und der Feststellungen anderer Autoren nehmen wir an, daß Chlorpromazin die Desaminierungsvorgänge in der Leber und in den Nieren beeinflußt.

Frau E. Nováková und Frl. M. Štrunková danken wir für ihre Hilfe und Mitarbeit bei den durchgeführten Untersuchungen.

Der Firma Specia danken wir für die freundliche Überlassung des Präparates.

Literatur

Bruscha, W.: Klin. Wschr. **1954**, 669.

Dasgupta, S. R., u. H. F. Häusler: Arch. exper. Path. u. Pharmakol. **228**, 188 (1956).

Georges, G., et J. Cahn: Anesth. et Analg. **10**, 409 (1953).

Georges, G., et J. Cahn: Cr. Soc. Biol. (Paris) **148**, 1806 (1954).

Holzbauer, M., and M. Vogt: Brit. J. Pharmacol. **9**, 402 (1954).

Hořejší, J., u. K. Slavík: Základy chemického vyšetřování v lékařství. Praha 1953.

Kovács, K.: Arch. internat. Pharmacodynamie **9**, 1—2 (1957).

Kovács, K.: Arch. internat. Pharmacodynamie **8**, 2 (1956).

Laborit, H.: Arch. exper. Path. u. Pharmakol. **222**, 41 (1954).

Lapteva, N. M.: Ž. Nêvropat. (russ.) **56**, 187 (1956).

Lehmann, H. E., and G. E. Hanrahan: Arch. of Neur. **71**, 227 (1954).

Moyer, J. H.: Amer. J. Med. Sci. **227**, 283 (1954).

Skuin, E. J.: Ž. Nêvropat. (russ.) **56**, 307 (1956).

Votava, Z., and J. Řežábek: Arch. internat. Pharmacodynamie CVIII, 3—4 (1956).

Dr. Theodor Braun, Institut der Ernährung, Physiologische Abteilung, Praha, Krč, Budêjovická ul. 800

Dr. Jan Neuwirt, Institut der experimentellen Pathologie, Praha II., U nemocnice 5

Arch. exper. Path. u. Pharmakol., Bd. 233, S. 233—236 (1958)

Aus dem physiologischen Institut der medizinischen Fakultät der Karlsuniversität in Pilsen (Vorstand: Doz. Dr. A. Zelený)

Zur Frage des herzmuskeleigenen Acetylcholins*

Von

J. Vlk

(Eingegangen am 9. September 1957)

Gemäß dem gegenwärtigen Wissen kann die Bedeutung des Acetylcholins für die Herztätigkeit nicht nur auf seine Beteiligung bei der Übertragung der Vagusimpulse auf das Myokard begrenzt werden. Abdon (1945) zog aus seinen Versuchen am isolierten Kaninchenherzen die Folgerung, daß das Acetylcholin im Herzen in gebundener, pharmakologisch unwirksamer Form („Acetylcholin-precursor") vorkommt; er stellte fest, daß eine Parallele zwischen dem Gehalt an gebundenem Acetylcholin und der Stärke der Herzkontraktionen besteht; Spaltung und Synthese des ACh-precursor gehören zum normalen Umsatz des Herzmuskels. Burn u. Vane (1949) sprachen die Vermutung aus, daß das im Herzen befindliche Acetylcholin eine wichtige Rolle bei den Vorgängen spielt, welche zu automatischen Kontraktionen führen. Bülbring u. Burn (1949) bewiesen, von dieser Hypothese ausgehend, daß die spontane Aktivität isolierter Kaninchenvorhöfe mit der in ihnen erfolgenden Synthese des Acetylcholins im Zusammenhang steht.

Rothschuh (1954) gelangt bei der Behandlung der Frage über die Bedeutung des Acetylcholins im Herzen zu der Ansicht, daß ACh im Körper 1. unabhängig von nervöser Tätigkeit vorkommt, 2. in den verschiedensten Organen in relativ großer Menge in einer inaktiven gebundenen Form enthalten ist. Das gilt auch für das Herz, wo nach Rothschuh außer seiner Beteiligung bei der Übertragung der Vagusimpulse noch die Rolle des Acetylcholins bei der Erregungsbildung und Erregungsleitung und bei der Kopplung von Erregung und Kontraktion in Betracht gezogen werden muß.

Uns interessierte die Beziehung dieses herzmuskeleigenen Acetylcholins zur Vagusinnervation des Herzens. Wir stellten uns die Frage, wie die einseitige Halsvagotomie den Acetylcholingehalt im Herzen beeinflußt. Weiters erschien es uns interessant festzustellen, wie sich die Menge von Acetylcholin im Herzen in den ersten Monaten des Lebens nach der Geburt ändert, wenn die Vagusinnervation des Herzens funktionell zur Ausbildung gelangt.

* Ich danke Herrn Dr. V. Lindaur, Physiol. Inst. Pilsen, für die statistische Auswertung der Ergebnisse.

1. Der Einfluß der einseitigen Halsvagotomie auf den Acetylcholingehalt der Herzvorhöfe bei Ratten. Die Versuche wurden an weißen Ratten beiderlei Geschlechtes im Durchschnittsgewicht von 235 g durchgeführt. Unter aseptischen Kautelen wurde den Ratten der rechte oder linke Vagus am Halse durchschnitten. Diesen Eingriff überlebten die Ratten ohne jedwede Folgen für den Gesamtzustand; die meisten Tiere hatten eine Ptose auf der entsprechenden Seite. Es waren daher im Nervenstamm, welcher bei der Reizung durch Induktorium am Herzen eine typische, negativ chronotrope Wirkung hervorrief, die aufsteigenden sympathischen Nervenfasern zugegen. Nach Ablauf von 13—22 Tagen nach der Vagotomie wurden die Ratten durch Abtrennen des Kopfes getötet und das Acetylcholin aus den Herzvorhöfen extrahiert und quantitativ durch die von Rothschuh (1954) beschriebene Methode festgestellt. Den Musculus rectus abdominis entnahmen wir normalen Fröschen ohne jedwede vorhergehende Sensibilisierung durch Mintacol oder einen anderen Inhibitor der Cholinesterase.

Die Ergebnisse sind in der Tab. 1 zusammengefaßt. Daraus geht klar hervor, daß die einseitige Vagotomie keinesfalls den Acetylcholingehalt

Tabelle 1

Nr.	Kontrolle Acetylcholin-gehalt	*Vagotomie*			
		Rechtsseitige		*Linksseitige*	
		Tage nach der Vagotomie	ACh-Gehalt	Tage nach der Vagotomie	ACh-Gehalt
1	3,96	13	2,55	13	2,93
2	3,67	16	2,92	14	3,43
3	3,29	16	3,00	15	4,39
4	3,97	16	3,26	16	4,00
5	3,30	16	3,32	16	2,77
6	3.20	16	4,75	16	3,21
7	3,67	16	3,50	17	4,28
8	3,55	19	4,02	17	2,93
9	3,86	19	4,09	17	3,43
10	3,81	22	2,57	19	3,06
M	3,628		3,398		3,443
	± 0,285		± 0,708		± 0,586
SE	0,09		0,226		0,186
		$t = 0{,}954$		$t = 0{,}898$	
		$p > 0{,}1$		$p > 0{,}1$	

Die Einwirkung der einseitigen Halsvagotomie auf den Acetylcholingehalt der Herzvorhöfe der Ratten. Der Acetylcholingehalt ausgedrückt in μg/1 g Frischgewicht.

der Herzvorhöfe signifikant beeinflußt. Dies bezeugt, daß das Acetylcholin des Herzens in bedeutendem Maße von der Innervation des Herzens durch den Vagus unabhängig ist. Es ist aber auch möglich, daß die Innervationssphären des rechten und linken Vagus einander im Herzen völlig durchdringen und der Einfluß der durchschnittenen Fasern durch die gegenseitigen Fasern ersetzt wird.

2. Der Acetylcholingehalt im Herzen junger Hunde in den ersten Monaten nach der Geburt. Die Versuche wurden an jungen deutschen Schäferhunden aus 4 Würfen durchgeführt. Der Acetylcholingehalt im Herzen wurde bei einer Gruppe von Hunden im Alter von 1—9 Tagen und bei einer anderen Gruppe im Alter von 4—5 Monaten festgestellt. Die Hunde wurden in leichter Äthernarkose, welche durchschnittlich 10 min anhielt, die jüngeren durch Abtrennung des Kopfes, die älteren durch Öffnung des Brustkorbes und Herausnahme des Herzens, getötet. Der Acetylcholingehalt wurde durch obenangeführte Methode festgestellt.

Die Resultate sind in der Tab. 2 enthalten. Da wir eine größere Menge von Gewebe zur Verfügung hatten, ermöglichte uns dies bei einem Tiere eine größere Anzahl von Proben zu entnehmen, so daß die Mehrzahl der

Tabelle 2

Nr.	Hunde im Alter von 1—9 Tagen		Hunde im Alter von 4—5 Monaten	
	ACh-Gehalt der Vorhöfe	ACh-Gehalt der Kammern	ACh-Gehalt der Vorhöfe	ACh-Gehalt der Kammern
1	1,22	Geringe Menge	3,24	1,11
2	1,97	„ „	4,58	0,93
3	1,56	„ „	2,18	0,93
4	1,19	„ „	3,27	0,95
5	1,28	„ „	2,97	1,44
6	1,93	„ „	2,91	0,73
7	1,41	„ „	5,00	1,25
8	1,72	„ „	4,36	0,65
9	1,30	„ „	3,73	1,59
10	1,09	„ „	2,66	0,35
M	1,467	—	3,605	0,993
	± 0,314	—	± 0,875	± 0,373
SE	0,101		0,276	0,118

$t = 7{,}15$
$p < 0{,}001$

Der Acetylcholingehalt im Herzen von Hunden in den ersten Monaten des Lebens. Der Acetylcholingehalt ist ausgedrückt in μg/1 g Frischgewicht. In den Herzkammern der sehr jungen Hunde befand sich eine derart geringe Menge von Acetylcholin, daß sich dieselbe bei gegebener Empfindlichkeit der Methode nicht genau quantitativ feststellen ließ.

angeführten Werte eigentlich die Durchschnittswerte von 2—3 Analysen darstellen; im ganzen wurden 73 Analysen durchgeführt. Wie aus der Tabelle entnommen werden kann, besteht ein markanter Unterschied zwischen dem Acetylcholingehalt im Herzen der jungen Hunde kurz nach deren Geburt und derer im Alter von 4—5 Monaten. Das Herz der älteren Hunde enthält 2—3mal mehr Acetylcholin als das Herz der kurz nach der Geburt getöteten jungen Hunde. Ein derart deutlicher Unterschied kann nicht durch verschieden großen Wassergehalt der Gewebe von Tieren verschiedener Altersstufen erklärt werden. Die Feststellung der

postnatalen Zunahme von Acetylcholin im Herzen bedeutet eine interessante Ergänzung der bereits am embryonalen Herzen gewonnenen Resultate: Vor der Eindringung der Vagusfasern in das Herz enthält das Myokard kein Acetylcholin und ist gegen Acetylcholin unempfindlich (Lissák, Töro u. Pasztor 1942, Šidlovskij 1947 u. a.).

Zusammenfassung

1. Die einseitige Halsvagotomie führt zu keinen signifikanten Veränderungen im Acetylcholingehalt der Herzvorhöfe bei Ratten. Die Durchschnittswerte betragen bei Kontrollratten 3,63, nach rechtsseitiger Vagotomie 3,40 und nach linksseitiger Vagotomie 3,44 μg ACh/1 g Frischgewicht.

2. In den ersten Monaten des postnatalen Lebens steigert sich der Acetylcholingehalt im Herzen von Hunden. In der ersten Woche nach der Geburt befindet sich in den Herzkammern eine geringe Menge von Acetylcholin, in den Herzvorhöfen durchschnittlich 1,47 μg ACh/1 g Frischgewicht. Weit größer ist die Menge von Acetylcholin bei Hunden im Alter von 4—5 Monaten: in den Herzkammern durchschnittlich 0,99, in den Herzvorhöfen 3,60 μg ACh/1 g Frischgewicht.

Literatur

Abdon, N.-O.: Acta pharmac. tox., K'hvn **1**, 169 (1945).
Bülbring, E., and J. H. Burn: J. of Physiol. **108**, 508 (1949).
Burn, J. H., and J. R. Vane: J. of Physiol. **108**, 104 (1949).
Lissák, K., J. Töro u. L. Pasztor: zit. nach T. M. Turpajev: Trudy Inst. morf. životnych **6**, 19 (1952).
Rothschuh, K. E.: Pflügers Arch. **258**, 406 (1954). — Klin. Wschr. **1954**, 1.
Šidlovskij, V. A.: zit. nach Ch. S. Koštojanc: Základy srovnávací fysiologie, Díl I. 335, Praha 1953.

Dr. J. Vlk, Physiolog. Inst. d. med. Fakultät Pilsen/ČSR

Arch. exper. Path. u. Pharmakol., Bd. 233, S. 237—249 (1958)

Aus dem Pharmakologischen Institut der Universität Frankfurt a. M.
(Direktor: Prof. Dr. P. Holtz)

Die Wirkung von Insulin und Reserpin auf den Adrenalin- und ATP-Gehalt der chromaffinen Granula des Nebennierenmarks *

Von
H. J. Schümann

Mit 1 Textabbildung

(Eingegangen am 6. November 1957)

Mit Hilfe des Differentialzentrifugierens lassen sich aus Nebennierenmarkhomogenaten zellfreie Suspensionen *chromaffiner Granula* gewinnen, die mehr als $^2/_3$ des Gesamthormongehaltes (Blaschko u. Welch; Hillarp, Lagerstedt u. Nilson) und daneben große Mengen Adenosintriphosphorsäure (ATP) enthalten (Hillarp, Högberg u. Nilson 1955). Elektronenmikroskopische Untersuchungen von Sjöstrand u. Wetzstein haben gezeigt, daß die Granula, die einen Durchmesser von etwa 0,175 μ besitzen, von einer Membran umgeben und deshalb als echte Zellorganellen anzusprechen sind.

In einer vor kurzem erschienenen Arbeit (Schümann 1957) gelang es, aus dem Nebennierenmark von Hühnern, dessen Hormongehalt sich aus durchschnittlich 64% Adrenalin und 36% Noradrenalin zusammensetzt, mit Hilfe der Ultrazentrifuge zwei verschiedene Arten granulärer Elemente zu gewinnen, von denen die eine, spezifisch leichtere, praktisch nur *Adrenalin* enthielt (Adrenalingranula), die andere, spezifisch schwerere, fast ausschließlich *Noradrenalin* (Noradrenalingranula).

Daneben ließ sich aus dem *Granulaausgangsgemisch* noch eine dritte Fraktion corpusculärer Elemente abtrennen, die keine nennenswerten Amin- und ATP-Mengen enthielt.

Die Tatsache, daß granuläre Elemente mit einem hohen Amingehalt auch reich an ATP sind und aminfreie Granula auch ATP-frei sind, wirft die Frage auf, ob physiologische Beziehungen zwischen Amin- und ATP-Gehalt bestehen.

Nach Carlsson u. Hillarp ist ATP für die Speicherung und Sekretion der Hormone von Bedeutung, da in Versuchen an *Ratten* die durch Insulin und in Versuchen an *Katzen* die durch Morphin verursachte Verarmung der Granula an Hormon von einer Abnahme des ATP-Gehaltes begleitet war. Demgegenüber fanden D'Iorio u. Eade, daß bei *Kaninchen*

* Ausgeführt mit Unterstützung der Deutschen Forschungsgemeinschaft.

der durch Insulin verursachten Aminverarmung keine Abnahme des ATP-Gehaltes parallel ging.

Im folgenden wird über Versuche an Hühnern und Ratten berichtet, in denen eine Hormonverarmung des Nebennierenmarks durch hohe *Insulin-* und *Reserpin*dosen hervorgerufen und der Einfluß der vermehrten Hormonfreisetzung auf den ATP- und Eiweißgehalt der einzelnen Fraktionen der chromaffinen Granula untersucht wurde.

Methodik

1. Präparation der Granula. Die dem frisch geschlachteten Tier entnommenen Nebennieren wurden gewogen und mit Hilfe eines Glashomogenisators in dem 20fachen Volumen isotonischer (0,3 mol) eiskalter Saccharoselösung homogenisiert. Durch niedertouriges Zentrifugieren (10 min 800 xg) wurden Zellfragmente, Erythrocyten und Zellkerne abgetrennt, darauf der Überstand 15 min lang mit 12000 xg zentrifugiert. Die überstehende, von corpusculären Elementen freie Lösung wurde verworfen; das Sediment, das die chromaffinen Granula enthält, wurde in isotonischer Saccharoselösung resuspendiert und nochmals mit 12000 xg zentrifugiert. Das erneut in isotonischer Saccharoselösung suspendierte Sediment *(Gesamtgranula)* diente als Ausgangsmaterial für die nun folgende Fraktionierung.

Alle Arbeitsgänge wurden in der Spinco-Ultrazentrifuge bei 0—2° C durchgeführt.

2. Fraktionierung der Granula mit Hilfe der Methode des Dichtegradienten. Zur Herstellung des Dichtegradienten wurden in einem Zentrifugenbecher aus Celluloid je 0,5 ml einer 2,0, 1,8, 1,6, und 1,4molaren Saccharoselösung sorgfältig übereinander geschichtet (siehe Abb. 1). Nach 2 Std langem erschütterungsfreiem Stehen bei 0° C wurde 1 ml der Granulasuspension auf den Gradienten gelagert und 30 min lang bei 142000 xg in dem Rotor SW 39 L der Spinco-Zentrifuge zentrifugiert. In einem aliquoten Teil des nicht zentrifugierten Granula-Ausgangsgemisches erfolgte in gleicher Weise wie später in den einzelnen durch Zentrifugieren gewonnenen Fraktionen die quantitative Bestimmung des Amin-, ATP- und Eiweißgehaltes.

Nach dem Zentrifugieren ergibt sich unter diesen Versuchsbedingungen (Schümann 1957) folgende Verteilung (Abb. 1): Die isotonische Saccharoselösung, in der die Granula, vor dem Zentrifugieren suspendiert, über dem Gradienten gelagert waren, ist jetzt praktisch frei von Granula (Fraktion 1), darunter findet sich eine an Granula besonders reiche Schicht (Fraktion 2), die aber keine nennenswerten Mengen an Amin und ATP enthält. Es folgt eine an Granula ärmere Schicht (Fraktion 3) und schließlich ein Sediment (Fraktion 4). Die Fraktion 3 besteht fast ausschließlich aus adrenalinhaltigen Granula („Adrenalin-Granula"), die Fraktion 4 dagegen aus einem Gemisch adrenalin- und noradrenalinhaltiger Granula („Misch-Granula"). Die Abb. 1 gibt ein Versuchsbeispiel[1].

Mit Hilfe eines besonders konstruierten Schneidegerätes wird der Celluloidbecher zuerst an der Grenze zwischen Fraktion 1 und 2 durchschnitten, wobei das Messer gleichzeitig Trennwand zwischen den beiden Fraktionen ist, so daß die Fraktion 1 abpipettiert werden kann. Der 2. Schnitt wird zwischen Fraktion 2 und 3 gelegt und Fraktion 2 abpipettiert. Die Fraktion 3 wird durch Dekantieren gewonnen. Die Fraktion 4 (Sediment) schließlich wird in isotonischer Saccharoselösung resuspendiert.

[1] Unter anderen Versuchsbedingungen — wiederholtes Zentrifugieren mit 44500 xg anstatt mit 142000 xg — erhält man umgekehrt in der spezifisch leichteren Fraktion 3 „Misch-Granula" und in der spezifisch schwereren Fraktion 4 fast reine „Noradrenalin-Granula" (Schümann 1957).

Die Granulafraktionen wurden mit eiskalter Trichloressigsäure versetzt, der Eiweißniederschlag abzentrifugiert, und die überstehende klare Lösung zur Entfernung der Trichloressigsäure mehrmals mit eiskaltem Äther bis zu einem p_H von 4—5 ausgeschüttelt. Ätherreste wurden durch 10 min langes Durchleiten von N_2 entfernt. Die ätherfreie wäßrige Lösung wurde für die Bestimmung des ATP- und Amingehaltes verwendet.

3. Aminbestimmung. Die Brenzcatechinamine wurden colorimetrisch nach v. Euler u. Hamberg bestimmt.

4. ATP-Bestimmung. Das verwendete Standard-ATP-Präparat stammte von der Firma Boehringer-Mannheim. Sein Gehalt an ATP wurde nach papierchromatographischer Abtrennung von ADP und AMP (Fleckenstein u. Gerlach) durch

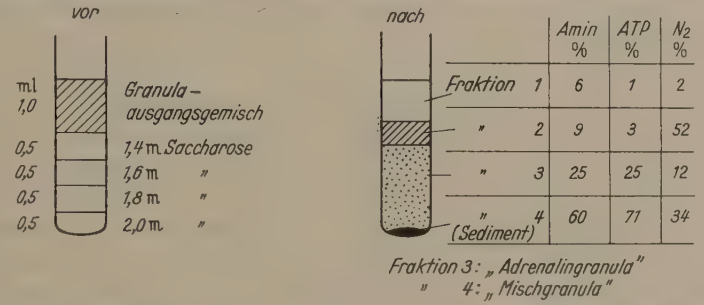


Abb: 1. Granulaverteilung nach dem Zentrifugieren über einem Dichtegradienten (siehe Methodik)

Bestimmung des ATP-Phosphorgehaltes (Berenblum u. Chain) ermittelt. Er betrug in Übereinstimmung mit den Angaben der Herstellerfirma 75%. Auch beim Vergleich mit dem mehr als 95%igen ATP der Firma Pabst, Milwaukee/USA mit Hilfe der für ATP spezifischen „Feuerfliegenmethode" (siehe weiter unten) ergab sich für das von uns benutzte Standardpräparat der Firma Boehringer ein Reinheitsgrad von 75%. — Der ATP-Gehalt der Granula wurde nach der von Strehler u. Totter angegebenen Feuerfliegenmethode bestimmt. Die Methode ist spezifisch für ATP und beruht auf dem Auftreten einer Bioluminescenz, die mit Hilfe eines Photomultipliers gemessen wird[1]. 20—25 Feuerfliegen werden mit 2,5 ml 0,1 mol. Arsenatpuffer, p_H 8,0, im Mörser verrieben; nach Abzentrifugieren wird der gelbliche Extrakt vom Niederschlag abgegossen und mit 10 mg $MgSO_4$, pro Milliliter Extrakt versetzt.

Für den Versuch werden 0,1 ml Feuerfliegenextrakt und 0,2—0,5 ml der zu prüfenden Lösung in die Cuvette pipettiert und mit 0,1 m Arsenatpuffer auf 1,0 ml aufgefüllt. 20 sec nach Herstellung des Reaktionsgemisches wird abgelesen.

Versuche

I. Die Wirkung von Insulin und Reserpin auf den Brenzcatechinamin- und ATP-Gehalt des Nebennierenmarks von Hühnern

a) Insulin[2]. Ausgewachsene Hühner im Gewicht von 1,6—2,5 kg erhielten nach 16stündigem Nahrungsentzug 500 IE/kg Alt-Insulin i.v. (Flügelvene), 14 Std später nochmals 1500 IE/kg. Nach weiteren 6 Std —

[1] Für die Überlassung getrockneter Feuerfliegen danke ich auch an dieser Stelle Herrn Professor Dr. W. D. McElroy, Baltimore/Maryland.

[2] Für die Überlassung ausreichender Mengen danke ich Herrn Professor Dr. G. Ehrhart, Farbwerke Hoechst AG.

20 Std nach der ersten Injektion — wurden die Tiere durch Entbluten getötet und die Nebennieren untersucht.

In der schon erwähnten früheren Arbeit (Schümann 1957) wurde auch über 2 Versuche an Hühnern berichtet, in denen die Tiere ähnlich hohe Insulindosen erhalten hatten. In dem einen Versuch hatte Insulin zu keiner signifikanten Hormonverarmung der Nebennieren geführt, in dem anderen ging der Hormonverarmung eine Abnahme der ATP-Gehaltes parallel.

In den jetzt mit 4 Kontrolltieren und 4 insulinbehandelten Tieren durchgeführten Versuchen betrug der Brenzkatechingehalt der aus den Nebennierenhomogenaten gewonnenen Granula-Ausgangsgemische („Gesamt-Granula") bei den Kontrollen im Mittel 327 γ/kg (Tab. 1). Auf diesen Mittelwert bezogen, verursachte Insulin im Durchschnitt der 4 Versuche in der gleichen Granulafraktion („Gesamt-Granula") eine Abnahme des Amingehaltes um 30% (auf 229 γ/kg). — An dieser Hormonverarmung ist die Fraktion der reinen Adrenalingranula (Fraktion 3, Abb. 1) nur wenig beteiligt; sie verliert 17% des normalen Amingehaltes. Überwiegend betroffen ist die Fraktion der Adrenalin und Noradrenalin enthaltenden „Mischgranula" (Fraktion 4, Abb. 1), die im Mittel um 46% an Amin verarmt (Tab. 1).

Der Hormonverarmung parallel geht nun eine Abnahme des ATP-Gehaltes: diese beträgt in der Fraktion der „Gesamt-Granula" 27%, bei den „Adrenalin-Granula" nur 12% und in der Fraktion der „Misch-Granula" 42% (Tab. 1).

Das vollkommene Parallelgehen der durch Insulin bedingten Abnahme des Hormon- und ATP-Gehaltes findet seinen Ausdruck auch darin, daß der unter Zugrundelegung des Molekulargewichtes von Adrenalin (183) und ATP (507) errechnete Quotient („mol. Quotient Adr./ATP in Tab. 1) bei der durch Insulin verursachten Verarmung an Amin und ATP in allen Fraktionen unverändert bleibt.

b) Reserpin[1]. Frühere Arbeiten hatten Anhaltspunkte dafür gegeben, daß der zu Hormonverarmung des Nebennierenmarks führenden Wirkung des *Reserpins* bei verschiedenen Tierarten ein verschiedener Mechanismus zugrunde liegt. Rückenmarkdurchschneidung in Höhe von C_6 verhinderte bei *Kaninchen* die sonst erfolgende Adrenalinverarmung vollständig, war dagegen bei *Ratten* ohne jeden Einfluß (Kroneberg u. Schümann); Iproniacid (Isopropylisonicotinsäureamid), das die Monoaminoxydase blockiert, verhinderte die sonst nach Reserpin zustande kommende Hormonverarmung bei *Ratten*, nicht aber bei *Kaninchen* (Holtz, Balzer u. Westermann). Im einen Fall scheint die Hormonverarmung hauptsächlich auf dem Wege einer *nerval* bedingten „Hypersekretion", im

[1] Der Firma Boehringer-Mannheim danke ich für die Überlassung von Reserpin.

Tabelle 1. *Die Wirkung von Insulin und Reserpin auf den Amin- und ATP-Gehalt (γ/kg Körpergewicht) der chromaffinen Granula der Hühnernebenniere*

(Versuchsdauer 20 Std; siehe Text). mol. Qu. = molarer Quotient. — K. Gew. = Körpergewicht. — NN. Gew. = Nebennierengewicht

Kontrollen				Insulin (2000 IE/kg)						Reserpin (1 mg/kg)					
Vers. Nr.	Amin γ/kg	ATP γ/kg	mol. Qu. Adr./ ATP	Vers. Nr.	Amin γ/kg	% Diff.	ATP γ/kg	% Diff.	mol. Qu. Adr./ ATP	Vers. Nr.	Amin γ/kg	% Diff.	ATP γ/kg	% Diff.	mol. Qu Adr./ ATP
Gesamtgranula															
1	305	128	6,6	5	240	—27	96	—39	7,0	9	79	—76	40	—74	5,5
2	306	130	6,5	6	250	—24	142	— 9	4,8	10	98	—70	51	—67	5,3
3	280	168	4,6	7	186	—43	95	—39	5,4	11	75	—77	40	—74	5,2
4	416	198	5,8	8	240	—27	125	—20	5,3	12	140	—57	81	—48	4,8
—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	13	79	—76	55	—65	4,0
Mittelwert	**327**	**156**	**5,7**		**229**	—30	**114**	—27	**5,6**		**94**	—71	**53**	—66	**5,0**
Adrenalingranula (Fraktion 3, Abb. 1)															
1	92	39	6,6	5	45	—41	22	—35	5,6	9	28	—63	18	—47	4,3
2	62	31	5,6	6	93	+22	51	+50	5,0	10	13	—83	7	—79	5,1
3	75	38	5,4	7	58	—24	27	—21	5,9	11	14	—82	10	—71	3,8
4	77	28	7,6	8	57	—25	20	—41	7,8	12	33	—57	20	—41	4,5
—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	13	26	—66	15	—56	4,8
Mittelwert	**76**	**34**	**6,3**		**63**	—17	**30**	—12	**6,0**		**23**	—70	**14**	—59	**4,5**
Mischgranula (Fraktion 4, Abb. 1)															
1	160	80	5,6	5	160	—26	65	—46	6,8	9	42	—80	18	—85	6,5
2	200	106	5,2	6	109	—50	90	—25	3,4	10	90	—58	42	—65	5,9
3	196	126	4,3	7	68	—68	40	—67	4,7	11	34	—84	28	—77	3,4
4	305	167	5,0	8	132	—39	84	—30	4,3	12	95	—56	54	—55	4,9
—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	13	42	—80	43	—64	2,7
Mittelwert	**215**	**120**	**5,0**		**117**	—46	**70**	—42	**4,8**		**60**	—72	**37**	—69	**4,7**
	K. Gew.	NN. Gew.		K. Gew.			NN. Gew.			K. Gew.			NN. Gew.		
Mittelwert	1,8 kg	179 mg		2,0 kg			213 mg			2,1 kg			187 mg		

anderen auf dem Wege einer *nicht nervalen* peripheren „Freisetzung" zu erfolgen. — Es war deshalb von Interesse, zu untersuchen, wie bei der gleichermaßen, aber wahrscheinlich mit einem verschiedenen Wirkungsmechanismus nach Insulin und Reserpin — durch „Sekretion" bzw. „Freisetzung" — erfolgenden Hormonverarmung die Relation Amin : ATP sich in den Granulafraktionen des Nebennierenmarks verhält.

Injiziert man Hühnern 1 mg/kg *Reserpin* i.v., so kommt es zu einer weit stärkeren Hormonverarmung des Nebennierenmarks als nach *Insulin*. 20 Std post injectionem ist der Katecholamingehalt der Fraktion der „Gesamt-Granula" von im Mittel 327 γ/kg (4 Kontrolltiere) auf 94 γ/kg (Mittelwert aus 5 Reserpinversuchen) abgesunken, d. h. um 71% (Tab. 1). Im Gegensatz zu den *Insulin*versuchen, in denen an der Abnahme des Hormongehaltes die „Adrenalingranula" weit weniger beteiligt waren als die „Mischgranula", sind nach *Reserpin* beide Granulafraktionen in gleichem Maße betroffen: die „Adrenalingranula" mit 70%, die „Mischgranula" mit 72%.

Während jedoch der ATP-Gehalt in den Fraktionen der „Gesamt-Granula" und der „Mischgranula" im gleichen prozentualen Verhältnis wie der Amingehalt abnimmt (um 66 bzw. 69%), trifft das für die Fraktion der „Adrenalin-Granula" nicht zu. In dieser Granulafraktion nimmt der ATP-Gehalt bei einer Hormonverarmung um 70% im Mittel nur um 59% ab. Der sich daraus ergebende molare Quotient Adrenalin/ATP liegt deshalb mit 4,5 deutlich niedriger als bei den Kontroll- bzw. Insulindosen, bei denen er für die Fraktion der „Adrenalin-Granula" 6,3 bzw. 6,0 beträgt. Das bedeutet, daß Reserpin im Gegensatz zu Insulin in der Fraktion der „Adrenalingranula" des Hühnernebennierenmarks eine Abnahme des *Hormongehaltes* verursacht, hinter der die Abnahme des *ATP-Gehaltes* zurückbleibt.

II. Der Eiweißgehalt der durch Insulin und Reserpin an Hormonen und ATP verarmten Granula-Fraktionen des Hühner-Nebennierenmarks

Die unter der Einwirkung von Sekretionsreizen erfolgende Amin- und ATP-Abgabe aus dem Nebennierenmark könnte so vonstatten gehen, daß es zu einem Austritt der beiden Stoffe aus den granulären Elementen käme, in denen sie gespeichert werden —, zu einem Durchtritt durch die Membran, von der diese umgeben sind, wobei die verarmten Granula *selbst* in der Zelle zurückblieben. Die schon lange zurückliegende Beobachtung des Vorkommens chromaffiner „Sekretgranula" im Nebennierenvenenblut und in den venösen Sinus des Nebennierenmarks (Vulpian; Cramer) weist andererseits auf die Möglichkeit hin, daß die Hormonsekretion durch eine Abgabe hormonhaltiger corpusculärer Elemente aus den chromaffinen Zellen vor sich geht. In diesem Falle

wäre zu erwarten, daß es bei einer Verarmung der Granulafraktionen des Nebennierenmarks an *Adrenalin* und *ATP* auch zu einer Abnahme des *Eiweiß*gehaltes käme.

Addiert man die Werte des Amin- bzw. ATP-Gehaltes der Granulafraktionen 3 und 4 (Abb. 1), d. h. der Fraktion der „Adrenalin-Granula" und der „Mischgranula" (Tab. 1), so ergibt die Summe praktisch den Amin- bzw. ATP-Gehalt des Granula-Ausgangsgemisches („Gesamt-Granula"). Dieses Granula-Ausgangsgemisch („Gesamt-Granula") enthält

Tabelle 2. *Die Wirkung von Insulin und Reserpin auf den Eiweißstickstoffgehalt (γN_2/kg Körpergewicht) der chromaffinen Granula der Hühnernebenniere*
Die Prüfung der Signifikanz der Differenz zweier Mittelwerte (p-Wert) erfolgte mit Hilfe der Standardabweichung (t-Test)

Vers. Nr.		Gesamt-granula	Adrenalin-granula (Fraktion 3)	Mischgranula (Fraktion 4)	Adrenalin + Mischgranula (Fraktion 3 + 4)
1	Kontrollen	168	27	55	82
2		217	26	88	114
3		302	26	113	139
4		273	38	67	105
	Mittelwert	**240**	**29**	**81**	**110**
5	Insulin	250	29	62	91
6	(2000 IE/kg)	202	67	43	110
7		242	57	65	122
8		279	54	63	117
	Mittelwert	**243**	**52**	**58**	**110**
	Differenz gegenüber Kontrollen	+1%	+79%	−29%	—
	p-Wert	>0,9	<0,1	<0,2	—
9	Reserpin	310	89	72	161
10	(1 mg/kg)	220	32	64	96
11		305	74	41	115
12		245	46	55	101
13		242	59	55	114
	Mittelwert	**264**	**60**	**57**	**117**
	Differenz gegenüber Kontrollen	+10%	+107%	−30%	+6%
	p-Wert	<0,9	<0,05	<0,2	<0,7

aber neben den amin- und ATP-reichen Fraktionen 3 und 4 auch die von Aminen und ATP fast freie Fraktion 2, die jedoch reich an corpusculären Elementen (z. B. Mitochondrien) ist. So erklärt sich, daß die Summe der Eiweiß-Stickstoffwerte der Fraktionen 3 und 4 weit unter den Werten der „Gesamt-Granula" liegt (Tab. 2).

Nach Insulin- und Reserpindosen, die zu einer deutlichen Abnahme des Amin- und ATP-Gehaltes der „Gesamt-Granula" sowie der Fraktionen 3 und 4 („Adrenalin"- und „Mischgranula") führen, bleibt nun der Eiweißgehalt in dem Granula-Ausgangsgemisch („Gesamt-Granula") unverändert und erfährt in den Granulafraktionen 3 und 4 lediglich eine Verschiebung: in der spezifisch schwereren Fraktion 4 („Sediment", „Mischgranula", siehe Abb. 1) nimmt er — wenn auch wegen der Streuung der Einzelwerte nicht signifikant — ab, in der spezifisch leichteren Fraktion 3 („Adrenalin-Granula") zu (Tab. 2). Die Erklärung dürfte sein, daß diejenigen Granula der Fraktion 4, die unter der Einwirkung von Insulin und Reserpin an Aminen und an ATP verarmten, *spezifisch leichter* wurden und deshalb beim Differenzierungs-Zentrifugieren nicht mehr in die Fraktion 4 eingingen, sondern in der Fraktion 3 blieben und deren Eiweißgehalt um den gleichen Betrag vermehrten, um den der Eiweißgehalt der Fraktion 4 vermindert wurde. Daraus folgt aber, daß der *Mechanismus*, nach dem die Abgabe von Hormonen und ATP aus den chromaffinen Zellen des Nebennierenmarks erfolgt, nicht in einer Ausstoßung hormon- und ATP-haltiger corpusculärer Elemente („Sekretgranula") besteht, sondern in dem Austritt von Hormonen und ATP durch die Membran der chromaffinen Granula, wobei diese selbst in der Zelle verbleiben.

III. Die Wirkung von Insulin auf den Hormon- und ATP-Gehalt der Ratten-Nebenniere

Eine *physiologische* Hormonsekretion führt nie zu einer Hormonverarmung der Inkretdrüse, da die Resynthese mit der Sekretion Schritt hält. Unter dem *unphysiologisch* starken Sekretionsreiz einer hohen *Insulin*dosis kann es jedoch zu einer Hormonverarmung des Nebennierenmarks kommen, da die Resynthese dann offenbar mit der Hormonabgabe *nicht* mehr Schritt hält. Was für die *Hormone* des Nebennierenmarks gilt, dürfte auch für das zusammen mit ihnen abgegebene *ATP* zutreffen: zu einer Verarmung an ATP wird es nur dann kommen, wenn die Resynthese mit der Abgabe nicht Schritt hält. Wenn nun auch, wie die in Versuchen an *Hühnern* gewonnenen Ergebnisse gezeigt haben, der Hormonabgabe aus dem Nebennierenmark eine Abgabe von ATP parallel geht, der Art, daß die durch Insulin verursachte *Hormon*verarmung mit einer im molaren Verhältnis erfolgenden Verarmung des Nebennierenmarks an *ATP* verbunden ist, so spricht das dafür, daß entweder eine Resynthese von Hormon und ATP während der Versuchszeit — 20 Std — nicht ins Gewicht fällt oder für beide mit gleicher Geschwindigkeit erfolgt, so daß der molare Quotient Hormon/ATP unverändert bleibt, wie es tatsächlich der Fall ist. Wenn das für die *Hühner*-Nebenniere zutrifft, so wäre sehr wohl vorstellbar, daß bei anderen Tierarten die Resynthese von

Hormon und ATP in einer an beiden verarmten Nebenniere *nicht* mit der gleichen Geschwindigkeit erfolgt, und deshalb der *Zeitfaktor* ausschlaggebend dafür sein muß, ob man nach einer zu Hormon- und ATP-Verarmung führenden Insulindosis eine gleichstarke Abnahme des Hormon- und ATP-Gehaltes und dementsprechend einen normalen, unveränderten „Quotienten" findet — oder nicht. So könnte der Zeitpunkt, zu dem untersucht wird, entscheidend dafür sein, ob die gefundene Relation Hormon/ATP die Annahme einer gleichzeitigen und in molarem Verhältnis erfolgenden Sekretion von Hormon und ATP nahelegt oder nicht.

Injiziert man *Ratten* 10 IE/kg *Insulin*, so ist der Adrenalingehalt der Nebennieren nach 3 Std von 220 γ/kg Körpergewicht auf 68 γ/kg, d. h. um 69% erniedrigt. In derselben Zeit hat der ATP-Gehalt von 160 auf 51 γ/kg, d. h. um 68% abgenommen (Tab. 3, Versuch 1). Im Versuch 2

Tabelle 3. *Die Wirkung von Insulin (10 IE/kg s.c.) auf den Adrenalin- und ATP-Gehalt der Rattennebenniere*

Versuch Nr. 1: 5 Gruppen zu je 5 Ratten (140—150 g). Versuch Nr. 2: 4 Gruppen zu je 6 Ratten (130—145 g). Versuch Nr. 3: 2 Gruppen zu je 6 Ratten (115—125 g). Versuch Nr. 4: 2 Gruppen zu je 6 Ratten (90—100 g)

Versuch Nr. 1						Versuch Nr. 2				
Stunden nach Insulin	Amin γ/kg	% Diff.	ATP γ/kg	% Diff.	mol. Qu. Adr./ ATP	Amin γ/kg	% Diff.	ATP γ/kg	% Diff.	mol. Qu. Adr./ ATP
—	220	—	160	—	3,8	202	—	140	—	4,0
3	68	—69	51	—68	3,7	74	—63	69	—51	3,0
6	70	—68	93	—42	2,0	73	—64	87	—38	2,3
9	56	—74	81	—49	1,9	—	—	—	—	—
24	96	—56	105	—34	2,5	94	—53	94	—33	2,7
Versuch Nr. 3						Versuch Nr. 4				
—	243	—	160	—	4,2	160	—	107	—	4,1
3	136	—44	91	—43	4,1	—	—	—	—	—
6	—	—	—	—	—	47	—70	65	—39	2,0

der gleichen Tabelle haben nach der gleichen Insulindosis Amin- und ATP-Gehalt im Verlaufe von 3 Std um 63 bzw. 51%, im Versuch 3 um 44 bzw. 43% abgenommen. Die molaren Quotienten Adrenalin/ATP sind deshalb in allen 3 Fällen praktisch unverändert geblieben: 3,8 bzw. 4,0 bzw. 4,2 bei den unbehandelten Kontrollen, 3,7 bzw. 3,0 bzw. 4,1 nach 3stündiger Insulinwirkung.

Verabfolgt man anderen Tiergruppen die gleiche Insulindosis, tötet die Tiere aber erst nach 6, 9 oder 24 Std, und untersucht die Nebennieren auf Adrenalin- und ATP-Gehalt, so ergibt sich, daß der *Hormongehalt* unverändert niedrig bleibt oder sogar noch stärker abnimmt, während

der *ATP-Gehalt* schon von der 6. Std an die Tendenz zum Wiederansteigen zeigt, so daß kleinere molare Quotienten resultieren (Tab. 3). Wenn man nicht annehmen will, daß eine in den ersten Stunden gleichstarke Sekretion von Hormon und ATP später durch eine mehr oder weniger isolierte Sekretion von Hormon allein ersetzt wird, so ist die nächstliegende Erklärung für die mit der Zeit sich ändernde Größe der Quotienten Adrenalin/ATP, daß die Resynthese von ATP schneller erfolgt als diejenige des Adrenalins.

Das Ergebnis der 3 Std-Versuche würde somit in Bestätigung der Resultate von Carlsson u. Hillarp an *Ratten* dafür sprechen, daß die Hormonabgabe aus dem Nebennierenmark mit einer im molaren Verhältnis erfolgenden Abgabe von ATP vergesellschaftet ist; das Ergebnis der 6-, 9- oder 24 Std-Versuche würde demgegenüber im Einklang mit den Versuchsergebnissen von D'Iorio u. Eade an *Kaninchen* stehen, daß bei der durch Insulin erzeugten Hypersekretion des Nebennierenmarks keine Parallelität zwischen Hormon- und ATP-Abgabe besteht. Für die *prinzipielle* Frage, ob mit einer vermehrten Hormongabe eine entsprechend vermehrte Abgabe von ATP einhergeht, ist das Ergebnis des akuten, *kurzfristigen* Versuches entscheidend, da hier aus *zeitlichen* Gründen interferierende Sekundärprozesse, insbesondere Resynthesevorgänge, am wenigsten die zu Verarmung führende Sekretion von Hormon und ATP überlagern. Dieses Ergebnis spricht eindeutig für eine in gleichem molaren Verhältnis erfolgende Abgabe von Nebennierenmarkhormon und ATP bei *Ratten*; im gleichen Sinne sprachen die im *langdauernden* Versuch (20 Std) an *Hühnern* erhaltenen Ergebnisse. Bei Ratten verläuft offensichtlich die Resynthese von ATP schneller als bei Hühnern.

Artspezifische Unterschiede der Fermentaktivitäten und dadurch bedingte Unterschiede der Geschwindigkeit, mit der die Abgabe eines Wirkstoffes durch Resynthese kompensiert wird, machen es deshalb notwendig, den *Zeitfaktor* zu beachten und in Rechnung zu setzen, wenn man die vielleicht bei allen Tierarten bestehende Verknüpfung von Adrenalin- und ATP-Abgabe aus den chromaffinen Granula des Nebennierenmarks nachweisen will.

Diskussion

1. Wenn man annimmt, daß Adrenalin bzw. Noradrenalin salzartig an das in den chromaffinen Granula vorhandene ATP gebunden sind, könnten maximal 4 Moleküle Amin durch 1 Molekül ATP in Bindung gehalten werden. Der molare Quotient Amin/ATP würde dann 4,0 betragen, wie das nach den Versuchsergebnissen an *Ratten* auch der Fall ist. In den Versuchen mit den durch Differentialzentrifugieren gewonnenen Granulafraktionen des *Hühner*-Nebennierenmarks schwankte der Quotient Amin/ATP zwischen 4 und 7. In den Fällen, in denen er größer

als 4,0 war, hätte deshalb die Bindungskapazität des ATP für die vorhandenen Aminmengen nicht ausgereicht. Da die zur ATP-Bestimmung benutzte Methode (Feuerfliegentest) spezifisch nur ATP, nicht z. B. ADP oder AMP erfaßt, bestände prinzipiell die Möglichkeit, daß das „überschüssige" Amin durch phosphorsäureärmere Adenosinderivate gebunden würde. Untersuchungen von Falck, Hillarp u. Högberg sprechen aber dafür, daß die in den chromaffinen Granula vorkommenden Adenosinverbindungen zu 80—90% aus ATP bestehen. Es kann deshalb keine befriedigende Erklärung dafür gegeben werden, daß die Amin/ATP-Quotienten in den Versuchen an *Hühnern* höher als 4,0 gefunden wurden, wenn man annimmt, daß die Amine *ausschließlich* in Bindung an ATP vorliegen. Das trifft auch für die Befunde anderer Autoren zu, die in den Mark-Granula z. B. der *Rinder*nebenniere in manchen Versuchen noch höhere Quotienten fanden (Falck, Hillarp u. Högberg; Blaschko, Born, D'Iorio u. Eade).

Daß andererseits doch wohl physiologische Beziehungen zwischen Aminen und ATP bestehen, wird durch die Ergebnisse der Insulin- und Reserpinversuche wahrscheinlich, in denen trotz starker Verarmung des Nebennierenmarks an Amin und ATP das molare Mengenverhältnis der beiden Stoffe fast unverändert blieb.

2. Das Ergebnis der *Reserpin*versuche wich in einem Punkt von demjenigen der *Insulin*versuche ab; in der Fraktion der Adrenalin-Granula veränderte sich der Quotient Amin/ATP unter *Insulin* nicht, während er unter *Reserpin* gegenüber den Kontrollwerten (6,3 im Mittel) deutlich kleiner wurde (4,5 im Mittel). Das würde bedeuten, daß die durch *Reserpin* verursachte Abnahme des Amingehaltes nicht von einer äquivalenten Abgabe von ATP begleitet sein muß. Dieser Unterschied zwischen der Insulin- und Reserpinwirkung könnte dadurch bedingt sein, daß dem Insulin die charakteristische Eigenschaft des Reserpins fehlt, nämlich die Bindung biogener Amine an Zell- und Gewebselemente aufzuheben. Trotzdem bliebe die Frage offen, weshalb der Unterschied zwischen Insulin- und Reserpinwirkung nur in der Fraktion der „Adrenalin-Granula", nicht aber in der Fraktion der „Misch-Granula" zum Ausdruck kommt (siehe Tab. 1).

Zusammenfassung

Es wurde die Wirkung von Insulin und Reserpin auf den Brenzcatechinamin-, ATP- und Eiweißstickstoffgehalt der chromaffinen Granula des Hühner-Nebennierenmarks untersucht, die durch Differentialzentrifugieren über einem Dichtegradienten als Fraktion der „Adrenalin-Granula" und der „Misch-Granula" (Adrenalin- + Noradrenalin-Granula) gewonnen wurden:

1. Sowohl im Granula-Ausgangsgemisch („Gesamt-Granula") als in den Fraktionen der Adrenalin- und Misch-Granula ging der durch *Insulin*

und *Reserpin* verursachten Verarmung an Brenzcatechinaminen eine Abnahme des ATP-Gehaltes parallel, so daß der molare Quotient Adrenalin/ATP unverändert blieb. Nur in der Fraktion der Adrenalin-Granula war dieser nach *Reserpin* kleiner als normal; das bedeutet, daß hier eine stärkere Verarmung an Adrenalin als an ATP eingetreten war.

2. In dem nach Insulin und Reserpin an Amin und ATP verarmten Granula-Ausgangsgemisch ist der *Eiweißstickstoffgehalt* gegenüber den Kontrollen unverändert. Daraus wird geschlossen, daß die Abgabe von Brenzcatechinaminen und ATP nicht in Form eiweißhaltiger corpusculärer Elemente oder eiweißgebundener Wirkstoffe erfolgt. — Es kommt jedoch zu einer Verschiebung des Eiweißstickstoffgehaltes zwischen der spezifisch leichteren Fraktion der Adrenalin-Granula und der spezifisch schwereren Fraktion der Adrenalin-Noradrenalin-Mischgranula. In der ersten Fraktion nimmt der Eiweißstickstoffgehalt zu, in der zweiten Fraktion ab. Die Ursache dieser Verschiebung wird darin erblickt, daß ein Teil der durch Amin- und ATP-Verlust spezifisch leichter gewordenen Mischgranula beim Differentialzentrifugieren nicht mehr sedimentiert und somit in der Fraktion der Adrenalingranula verbleibt.

3. Der *Mechanismus* der durch Reserpin und Insulin verursachten Verarmung der chromaffinen Granula an Brenzcatechinamin wird diskutiert.

An *Ratten* wurde die Wirkung von Insulin auf den Adrenalin- und ATP-Gehalt des Nebennierenmarks untersucht:

1. auch bei Ratten kam es nach *Insulin* zu einer äquivalenten Verarmung des Nebennierenmarks an Adrenalin und ATP, wenn man drei Stunden nach der Insulininjektion untersuchte;

2. der zu diesem Zeitpunkt gegenüber den Kontrollen unveränderte molare Quotient Adrenalin/ATP erfuhr jedoch nach 6, 9 und 24 Std gegenüber dem Normalwert eine Verkleinerung. Er betrug anstatt 4,0 (normal) nur 2,0. Das bedeutet, daß nicht mehr 4 Moleküle, sondern nur mehr 2 Moleküle Adrenalin auf 1 Molekül ATP entfallen;

3. daraus wird geschlossen, daß — im Gegensatz zur Hühnernebenniere — die *Resynthese* des ATP schneller erfolgt als diejenige des Adrenalins.

Fräulein Christiane Bischof danke ich für ihre verständnisvolle Mitarbeit.

Literatur

Berenblum, J., and E. Chain: Biochemic. J. **32**, 295 (1938).
Blaschko, H., u. A. D. Welch: Arch. exper. Path. u. Pharmakol. **219**, 17 (1953).
Blaschko, H., G. V. Born, A. D'Iorio and N. R. Eade: J. of Physiol. **132**, 44 P (1956).
Carlsson, A., and N.-A., Hillarp: Acta physiol. scand. (Stockh.) **37**, 235 (1956).
Cramer, W.: J. of Physiol. **52**, 8 (1918).

D'Iorio, A., and N. R. Eade: J. of Physiol. **133**, 17 P (1956).
Euler, U. S. v., and U. Hamberg: Acta physiol. scand. (Stockh.) **19**, 74 (1949).
Falck, B., N.-A. Hillarp and B. Högberg: Acta physiol. scand. (Stockh.) **36**, 306 (1956).
Fleckenstein, A., u. E. Gerlach: Arch. exper. Path. u. Pharmakol. **219**, 531 (1953).
Hillarp, N.-A., S. Lagerstedt and B. Nilson: Acta physiol. scand. (Stockh.) **29**, 251 (1953).
Hillarp, N.-A., B. Högberg and B. Nilson: Nature (Lond.) **176**, 1032 (1955).
Holtz, P., H. Balzer u. E. Westermann: Arch. exper. Path. u. Pharmakol. **231**, 361 (1957).
Kroneberg, G., u. H. J. Schümann: Arch. exper. Path. u. Pharmakol. **231**, 349 (1957).
Schümann, H. J.: J. of Physiol. **137**, 318 (1957).
Sjöstrand, F. S., u. R. Wetzstein: Experientia (Basel) **12**, 196 (1956).
Strehler, B. L., and J. R. Totter: Arch. of Biochem. a. Biophysics **40**, 28 (1952).
Vulpian, D.: C. r. Acad. Sci. (Paris) **43**, 663 (1856).

Prof. Dr. H. J. Schümann, Pharmakologisches Institut der Universität Frankfurt/Main, Ludwig-Rehn-Straße 14

Arch. exper. Path. u. Pharmakol., Bd. 233, S. 250—254 (1958)

Aus dem Pharmakologischen Institut der Universität Mainz
(Direktor: Prof. Dr. G. Kuschinsky)

Die Wirkung von Lösungsvermittlern des Theophyllin auf die Kontraktionskraft des Katzenpapillarmuskels

Von
G. Kuschinsky und E. Muscholl

(Eingegangen am 30. November 1957)

Verschiedene Lösungsvermittler, die in pharmazeutischen Präparaten enthalten sind, besitzen in den Dosen, die therapeutisch zur Anwendung gelangen, klinische Wirkungen und sind daher eigentlich Pharmaka. Oft wird die Kombination von Theophyllin mit einem Lösungsvermittler als Ursache einer Wirkungsverstärkung des Theophyllins angesehen (Übersicht z. B. Brockmann).

Uns interessierte, ob die Wirkung von Theophyllin auf die Kontraktionskraft des Herzmuskels durch die Lösungsvermittler modifiziert wird. Hardman, Yard u. Chenoweth fanden am Herz-Lungen-Präparat des Hundes, daß Äthylendiamin die Wirkungsdauer von Theophyllin verlängert und daß es selbst eine Steigerung des Minutenvolumens hervorruft; da diese Wirkung ohne Frequenzzunahme einherging, wurde dem Äthylendiamin ein positiv inotroper Effekt zugeschrieben. Demgegenüber fanden Howarth, McMichael u. Sharpey-Schafer keine Steigerungen des Herzminutenvolumens bei Verabreichung therapeutischer Dosen von Äthylendiamin (wie sie im Aminophyllin enthalten sind) am Menschen. Äthylendiamin besitzt jedoch starke vasculäre Wirkungen, die einen möglicherweise vorhandenen direkten Angriff am Myokard maskieren können. Daher ist die Frage einer inotropen Beeinflussung des Herzens durch Äthylendiamin noch offen.

Wir untersuchten außer Äthylendiamin noch die folgenden Lösungsvermittler: Monoäthanolamin, Diäthanolamin und Diäthylaminoäthanol. Da in den verschiedenen Handelspräparaten das molare Verhältnis zwischen Lösungsvermittler und Theophyllin von 0,8:1 bis 2:1 schwankt, wurde von uns einheitlich das Verhältnis 1:1 gewählt, um die Substanzen untereinander vergleichbar zu machen.

Methodik

Papillarmuskeln vorwiegend junger Katzen wurden wie früher beschrieben (Kuschinsky u. Muscholl 1956, 1958) entnommen und in O_2-durchperlter Tyrodelösung bei 37° C in einem Organbad aufgehängt. Die elektrisch ausgelösten Kontraktionen (48/min) wurden mit Hilfe eines isometrisch arbeitenden

Torsionsmyographen registriert. Die Tyrodelösung hatte folgende Zusammensetzung: NaCl 8,0 g; KCl 0,2 g; $CaCl_2$ 0,2 g; $MgCl_2$ 0,1 g; $NaHCO_3$ 1,0 g; NaH_2PO_4 0,05 g; Glucose 1,0 g; Aqua dest. ad 1000 ml.

Die untersuchten Lösungsvermittler wurden in 10%iger wäßriger, mit HCl neutralisierter Lösung und Theophyllin in physiologischer NaCl-Lösung gelöst in das Organbad gegeben. Ausspülen der Substanzen erfolgte durch dreimaligen Badwechsel; danach wurde mindestens 30 min bis zum nächsten Effekt gewartet.

Ergebnisse

1. Wirkung der Lösungsvermittler. Die Lösungsvermittler entfalten in Konzentrationen von ½ und 1 mM/l die in Tab. 1 dargestellten Effekte. Die Kontraktionskraft wurde kurz vor Gabe der Substanz (Ausgangswert) sowie 5 und 10 min danach gemessen. Während Monoäthanolamin und Diäthylaminoäthanol in der niedrigeren Konzentration bereits einen signifikant von Null abweichenden Effekt aufwiesen, wirkte Diäthanolamin erst in der Dosis 1 mM/l positiv inotrop. Äthylendiamin besaß in beiden untersuchten Konzentrationen keinen signifikanten Effekt. Alle Substanzen konnten wiederholt an ein und demselben Papillarmuskel getestet werden, sie schädigten das Organ nicht. Die positiv inotropen Wirkungen der Lösungsvermittler waren um ein Vielfaches geringer als diejenigen des Theophyllin (s. u.).

Tabelle 1. *Wirkung der Lösungsvermittler auf die Kontraktionskraft des Papillarmuskels*
Durchschnittliche Veränderungen $\pm s_x$ in Prozent des Ausgangswertes. *P*-Wert der Differenz gegen Null angegeben, sofern der Unterschied nach dem *t*-Test signifikant ist

	½ mM/l			1 mM/l		
	5 min	10 min	Anzahl der Effekte	5 min	10 min	Anzahl der Effekte
Monoäthanolamin	$+10{,}3 \pm 3{,}51$ $P < 0{,}02$	$+ 8{,}5 \pm 3{,}18$ $P < 0{,}05$	12	$+ 9{,}8 \pm 2{,}46$ $P < 0{,}01$	$+11{,}4 \pm 3{,}56$ $P < 0{,}02$	8
Diäthanolamin	$+ 0{,}7 \pm 3{,}66$ —	$+ 3{,}4 \pm 2{,}67$ —	11	$+16{,}6 \pm 4{,}8$ $P < 0{,}01$	$+22{,}6 \pm 6{,}15$ $P < 0{,}01$	10
Äthylendiamin	$+ 1{,}5 \pm 2{,}84$ —	$+ 8{,}8 \pm 4{,}41$ —	16	$+ 2{,}4 \pm 3{,}82$ —	$+ 7{,}4 \pm 3{,}77$ —	8
Diäthylaminoäthanol	$+11{,}5 \pm 4{,}11$ $P < 0{,}05$	$+11{,}3 \pm 4{,}06$ $P < 0{,}05$	8	$+15{,}8 \pm 4{,}53$ $P < 0{,}01$	$+16{,}3 \pm 4{,}35$ $P < 0{,}01$	9

2. Kombination der Lösungsvermittler mit Theophyllin. *a) Gleichzeitige Gabe.* In diesen und in früheren Versuchen nahm die Kontraktionskraft des Papillarmuskels nach 5 bzw. nach 10 min im Mittel um 58 bzw. 66% zu, wenn Theophyllin in einer Konzentration von ½ mM/l einwirkte. Es wurde nun untersucht, ob gleichzeitige Gabe eines Lösungsvermittlers den Effekt von Theophyllin mehr beeinflußte als von der oben gezeigten Eigenwirkung der Substanzen zu erwarten war.

Tabelle 2. *Wirkung einer gleichzeitigen Gabe von Theophyllin und einem Lösungsvermittler (je ½ mM/l) auf die Kontraktionskraft des Papillarmuskels, bezogen auf den Effekt von Theophyllin allein (= ± 0)*

Durchschnittliche Veränderungen $\pm s_{\bar{x}}$ in Prozent. Differenzen gegenüber Theophyllin nach dem *t*-Test nicht signifikant außer [1] $P < 0{,}05$ und [2] $P < 0{,}02$

	5 min	10 min	Anzahl der Effekte	Papillarmuskeln
Theophyllin	± 0	± 0	45	15
Theophyllin + Monoäthanolamin	+ 1,2 ± 5,97	+ 4,5 ± 4,95	6	5
Theophyllin + Diäthanolamin	+ 8,3 ± 4,70	+ 7,6 ± 3,81	9	8
Theophyllin + Äthylendiamin . .	+ 8,9 ± 3,24[1]	+11,5 ± 3,43[2]	8	6
Theophyllin + Diäthylaminoäthanol	+ 3,3 ± 3,60	+ 6,1 ± 4,2	12	7

Die Streuung der Zunahme der Kontraktionskraft war an ein und demselben Papillarmuskel kleiner als von Muskel zu Muskel. Daher wurde der Effekt einer Kombination von Lösungsvermittler und Theophyllin zu den an demselben Muskel gemessenen Wirkungen von Theophyllin in Beziehung gesetzt. Die an 15 Papillarmuskeln gewonnenen Resultate zeigt Tab. 2. Es wurden an jedem Muskel je 3 Effekte mit ½ mM/l Theophyllin gesetzt und stets Kombinationen von mehr als einem einzigen Lösungsvermittler mit Theophyllin geprüft. Gleichzeitig mit Theophyllin einwirkende Lösungsvermittler riefen einen größeren Anstieg der Kontraktionskraft gegenüber den mit Theophyllin allein beobachteten Werten hervor. Die Zunahme der Kontraktionskraft betrug allerdings nur wenige Prozent und war nur im Fall des Äthylendiamin signifikant. Da die Kontraktionszunahmen durch die Lösungsvermittler mit oder ohne Theophyllin statistisch gleichgroß sind (vgl. 10 min-Werte für ½ mM/l Tab. 1 mit Tab. 2), liegt jeweils eine Addition der positiv inotropen Wirkung beider Substanzen vor.

b) Nachzeitige Gabe. Da die Streuung der Kontraktionszunahmen durch Theophyllin von einem Effekt zum nächsten an ein und demselben

Papillarmuskel zu groß erschien, um den minimalen Effekt der Kombination mit einem Lösungsvermittler getrennt zu erfassen, wurde die Wirkung der Lösungsvermittler auf den *Verlauf* der Theophyllineffekte untersucht. Wie schon früher mitgeteilt (Kuschinsky u. Muscholl 1956), wird die Kontraktionskraft des Papillarmuskels durch Theophyllin innerhalb der ersten 10 min gesteigert, fällt dann aber etwas ab und bleibt längere Zeit auf einem dem Ausgangswert gegenüber erhöhten Niveau

Tabelle 3. *Wirkung der Lösungsvermittler auf den Verlauf des Theophyllineffektes am Papillarmuskel*

Durchschnittliche Veränderungen $\pm s_{\bar{x}}$ der Kontraktionskraft in Prozent, bezogen auf den 10 min nach Zusatz von Theophyllin gemessenen Wert (= 0). Differenzen gegenüber dem Kontrollwert mit dem t-Test bestimmt. Alle Substanzen $^1/_2$ mM/l

10 min nach Theophyllin Zusatz von	5 min (15 min nach Th.)	Stat. Differenz gegenüber Kontr.	10 min (20 min nach Th.)	Stat. Differenz gegenüber Kontr.	Anzahl der Effekte
Kontrolle . . .	$-8{,}7 \pm 4{,}36$	—	$-11{,}0 \pm 3{,}1$	—	10
Monoäthanolamin	$+6{,}0 \pm 1{,}95$	$P<0{,}02$	$+7{,}1 \pm 2{,}95$	$P<0{,}001$	8
Diäthanolamin .	$-2{,}1 \pm 2{,}54$	$P>0{,}05$	$-1{,}1 \pm 3{,}05$	$P<0{,}05$	8
Äthylendiamin .	$-1{,}1 \pm 1{,}94$	$P>0{,}05$	$+0{,}6 \pm 3{,}55$	$P<0{,}05$	9
Diäthylaminoäthanol	$+1{,}4 \pm 1{,}71$	$P<0{,}05$	$+4{,}4 \pm 5{,}11$	$P<0{,}02$	10

bestehen. Bei den in Tab. 3 näher geschilderten Versuchen wurde 10 min nach Gabe von Theophyllin einer der Lösungsvermittler zugesetzt und weitere 10 min beobachtet. Wurde der 10 min nach Theophyllin gemessene Wert gleich Null gesetzt, so fiel bei den Kontrollen die Kontraktionskraft im Mittel von 10 Versuchen nach weiteren 5 min um 8,7% und nach 10 min um 11% ab (der letzte Wert ist aber gegenüber dem Ausgangswert vor Gabe des Theophyllins noch um 53% gesteigert). Zusatz der Lösungsvermittler 10 min nach Theophyllin und somit etwa im Maximum der Theophyllin-Wirkung führte zwar nur in einzelnen Fällen zu einer weiteren zahlenmäßigen Steigerung der Kontraktionskraft (s. Tab. 3), jedoch war die Differenz zu den Kontrollen für jeden der Lösungsvermittler nach 10 min Einwirkungszeit signifikant.

Die Versuche zeigen, daß die Lösungsvermittler, im Maximum des Theophyllineffektes gegeben, den Abfall der Theophyllin-Wirkung signifikant hemmen. Man kann diese Wirkung jedoch nicht als eine echte Verlängerung der Theophyllin-Wirkung ansehen, da die Differenz zu den Kontrollen statistisch gleichgroß dem Eigeneffekt der Lösungsvermitter (vgl. mit Tab. 1) ist.

Summary

The influence of ethylenediamine, ethanolamine, diethylaminoethanol and diethanolamine on the positive inotropic response produced by theophylline on the isolated papillary muscle of the cat was studied.

When no theophylline was added the drugs in doses of ½—1 mM/l caused a small increase in contractile force. Theophylline (½ mM/l) produced a pronounced and prolonged positive inotropic response. When theophylline and one of the amines were given simultaneously or successively the effects ot both drugs were additive. There was no reason to assume a potentiating effect of either ethylenediamine, ethanolamine, diethylaminoethanol and diethanolamine.

Wir danken Frl. H. Wagner für ihre Mitarbeit bei den Versuchen.

Literatur

Brockmann, A. W.: Die Entwicklung der Theophyllin-Therapie und ihre klinische Bedeutung. Arzneimittel-Forsch. **4**, 444 (1954).

Hardman, H. F., A. C. Yard and M. B. Chenoweth: The effect of the ethylenediamine component of aminophylline on the duration of reversal of cardiac failure. J. Pharmacol. exp. Ther. **109**, 461 (1953).

Howarth, S. H., J. McMichael and E. P. Sharpey-Schafer: The circulatory action of theophylline ethylenediamine. Clin. Sci. **6**, 125 (1947).

Kuschinsky, G., u. E. Muscholl: Die Wirkung von Theophyllin, Coffein und Theobromin auf Kontraktionskraft, Erregbarkeit, Refraktärzeit und Spontanfrequenz des isolierten Herzmuskels der Katze. Naunyn-Schmiedeberg's Arch. exp. Path. Pharmak. **229**, 348 (1956).

Kuschinsky, G., u. E. Muscholl: Die Wirkung neuer Theophyllin- und Theobrominderivate auf die Kontraktionskraft des Herzmuskels. Arzneimittel-Forsch. **8**, 14 (1958).

Prof. Dr. G. Kuschinsky, Pharmakol. Institut, Mainz, Langenbeckstr. 1

Arch. exper. Path. u. Pharmakol., Bd. 233, S. 255—260 (1958)

Aus dem Pharmakologischen Institut der Universität Innsbruck
(Direktor: Prof. Dr. A. Jarisch)

Eine Methode zur gleichzeitigen Erfassung pharmakologischer Wirkungen auf das Atemzentrum und die neuromuskuläre Übertragung

Von
C. Job und W. Schaumann

Mit 4 Textabbildungen

(Eingegangen am 29. Oktober 1957)

Nach den Ergebnissen von De Candole et al. blockieren Cholinesterase-Hemmer die neuromuskuläre Übertragung. Die zentralen Wirkungen der Cholinesterase-Hemmer können daher durch die Beobachtung reflektorischer Muskelkontraktionen oder der Atembewegungen nicht sicher erfaßt werden (Schaumann). Man kann diese Schwierigkeit durch Ableitung der Aktionspotentiale der motorischen Nerven umgehen. Für sich allein angewandt, hat dieses Verfahren aber den Nachteil, daß die praktisch wichtige Hemmung der neuromuskulären Übertragung der Beobachtung entgeht. Es war daher eine Methode zu finden, mit der die elektrische Aktivität des Nerven und die Muskelkontraktionen gleichzeitig registriert werden können.

Bei Untersuchungen von Granit u. Job über den Einfluß der Muskelkontraktionen auf die monosynaptische Erregbarkeit der Motorneuronen des Rückenmarks wurde ein ähnliches Problem in der Weise gelöst, daß Aktionspotentiale von einem dünnen abgespaltenen Filament der Vorderwurzel abgeleitet wurden, während der größere Teil des Nerven intakt blieb und den Muskel zur Kontraktion brachte. Bei der Innervation der Atem-Muskulatur liegen günstigere anatomische Verhältnisse vor: die vom Atemzentrum ausgehenden Impulse laufen symmetrisch über beide Nn. phrenici zum Zwerchfell. Man kann daher die Aktionspotentiale vom zentralen Stumpf des einen Nerven ableiten und gleichzeitig die Kontraktionen der anderen, innervierten Zwerchfellhälfte registrieren. Im folgenden wird eine Methode beschrieben, die auf diesem Prinzip beruht.

Methode

Die Versuche wurden an Ratten in Urethan-Narkose durchgeführt. Der Blutdruck wurde in der Art. Carotis mit einem Membran-Manometer gemessen und kymographisch aufgezeichnet. Injektionen erfolgten in die Vena jugularis. Beide

Nn. vagi wurden durchschnitten, um afferente Impulse von den Lungendehnungs-Receptoren auszuschalten. Das Zwerchfell wurde sagittal gespalten und die Kontraktionen der rechten Hälfte über einen isometrisch arbeitenden mechano-elektrischen Transducer oszillographisch registriert. Der linke N. phrenicus wurde am Hals freigelegt und peripher durchschnitten. Seine Aktivität wurde unter Paraffin abgeleitet. Die künstliche Beatmung wurde so eingestellt, daß noch annähernd normale spontane Atembewegungen auftraten.

Um die Beurteilung der Atemtätigkeit aus der Stärke und Dauer der Impuls-Salven zu erleichtern, wurde ein Integrator konstruiert, der die Aktionspotentiale eines Atemzuges sammeln konnte. Der elektrisch negative Anteil der mehr oder weniger biphasischen Impuls-Salven wurde einem RC-Glied zugeführt, dessen Zeitkonstante so bemessen war, daß der Kondensator oder Sammler sich während der Atempause entladen konnte. Abb. 1 zeigt die Schaltung des Gerätes. Die Einspeisung erfolgt durch die Spannung zwischen Erde und einer Ablenkplatte der Braunschen Röhre (B), mit der die Aktionspotentiale des N. phrenicus aufgezeichnet werden. Die Gleichspannung zwischen der Ablenkplatte und Erde wird durch den Kondensator (C_1) abgeriegelt. Der positive Teil der Aktionspotentiale wird durch den Gleichrichter (G) zur Erde abgeleitet, der negative Teil lädt über einen Widerstand (R_1) den Sammler (C_2). Die Entladung des Sammlers erfolgt über den Gitterableitwiderstand (R_2) des Verstärkers, der die Spannung am Sammler (C_2) mißt.

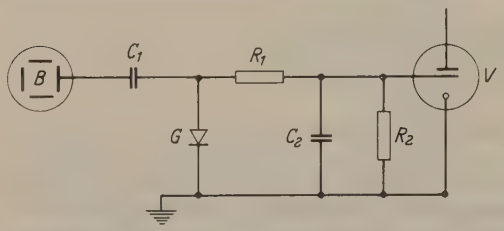


Abb. 1. *Schaltskizze des Impulsintegrators.* B Braunsche Röhre; V Verstärkereingang. Abmessungen der Schaltelemente: C_1 0,04 μF; C_2 0,15 μF; R_1 10 MΩ; R_2 2 MΩ

Die Zwerchfell-Kontraktionen, die Impuls-Salven im N. phrenicus und deren Summierung wurden gleichzeitig beobachtet und photographiert. Integrator und Transducer wurden aufeinander abgestimmt, so daß bei normaler Atemtätigkeit beide etwa gleichstarke Ausschläge auf dem Bildschirm ergaben. Die Integratorspannung wurde durch eine mehr oder weniger hohe Verstärkung der vom N. phrenicus abgeleiteten Potentiale reguliert. Dadurch konnten die Abmessungen des Integrators konstant gehalten werden.

Abb. 2 zeigt die Relation zwischen der elektrischen Aktivität des N. phrenicus und den Kontraktionen des Zwerchfells. Zu Beginn des Versuches wurde das Tier hyperventiliert, bis eine Apnoe eintrat; in Abb. 2a ist keine spontane Atemtätigkeit mehr vorhanden. Durch allmähliche Verminderung der Belüftung wurde die Atmung wieder in Gang gebracht und bis zur Hyperpnoe gesteigert. In Abb. 2b liefen die ersten schwachen Impuls-Salven über den N. phrenicus, und die Zwerchfell-Kontraktionen waren entsprechend schwach. Die Ausschläge des Integrators und die Zwerchfell-Kontraktionen nahmen in Abb. 2c u. d annähernd parallel zu. In Abb. 2e wurde die weitere Zunahme der elektrischen Aktivität des Nerven jedoch nicht mehr von entsprechend stärkeren Muskelkontraktionen begleitet. Es ist nicht sicher, ob es sich hier um eine supramaximale Innervation handelt, oder ob aus

methodischen Gründen die weitere Zunahme der Muskelkontraktionen nicht mehr erfaßt wurde. Die Divergenz zwischen elektrischer und mechanischer Aktivität bei starker Atemtätigkeit muß bei der Beurteilung einer peripheren Wirkung von Stoffen mit vorwiegend zentralem

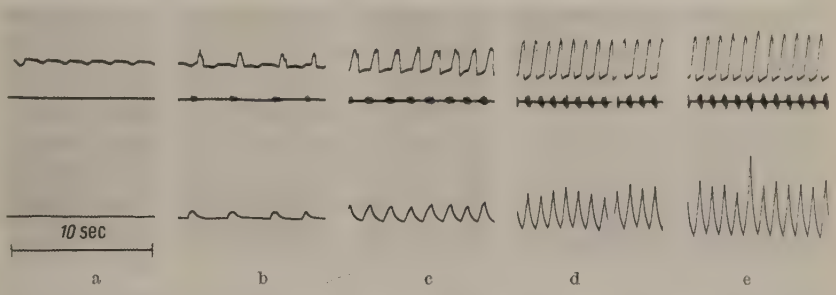


Abb. 2a—e. Ratte, 300 g. *Zunehmende Atemtätigkeit infolge verminderter Belüftung.* Von oben nach unten: Zwerchfellkontraktionen; Aktionspotentiale des linken N. phrenicus; integrierte Aktionspotentiale

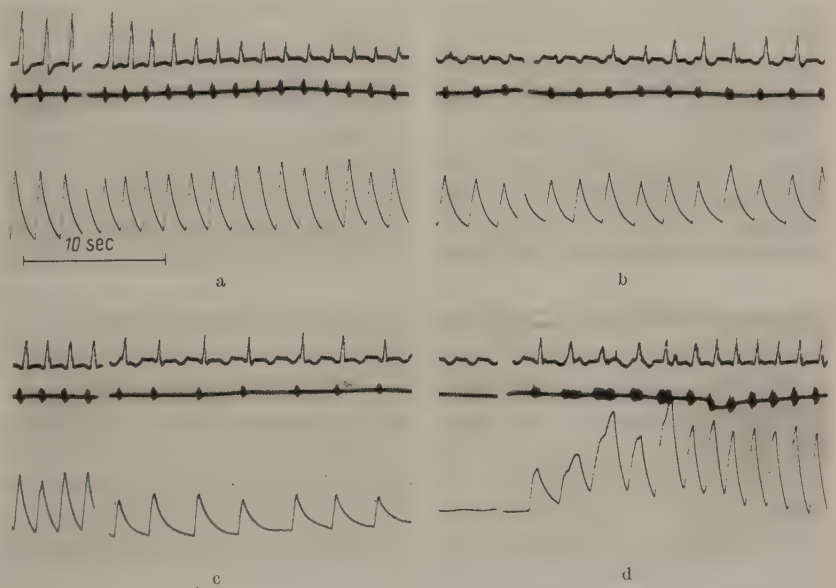


Abb. 3a—d. Ratte, 190 g. *Wirkung peripher oder zentral lähmender bzw. erregender Pharmaka auf die Aktionspotentiale des N. phrenicus und die Kontraktionen des Zwerchfells.* Versuchsanordnung wie in Abb. 2. Bei a 0,1 mg/kg Curare, bei b 0,5 mg/kg Prostigmin, bei c 15 mg/kg Morphin, bei d 3 mg/kg Lobelin

Angriffspunkt berücksichtigt werden. Am besten ermittelt man die Relation zwischen elektrischer und mechanischer Aktivität bei starker und schwacher Atmung zu Beginn eines jeden Versuches.

Um die Brauchbarkeit der Methode zu prüfen, untersuchten wir die Veränderungen von Phrenicus- und Zwerchfell-Tätigkeit unter dem Einfluß von Substanzen mit bekannter peripher oder zentral lähmender bzw. erregender Wirkung. Einen solchen Versuch zeigt Abb. 3. 0,1 mg/kg Curare lähmten rasch die Zwerchfell-Kontraktionen (Abb. 3a). Die elektrische Aktivität des N. phrenicus blieb entweder unverändert oder zeigte eine geringe Zunahme von Amplitude und Frequenz. Nach 0,5 mg/kg Prostigmin kehrten die Zwerchfell-Kontraktionen wieder, erreichten aber, wie in den meisten Fällen, nicht ihre ursprüngliche Höhe und Dauer (Abb. 3b). Die Ausschläge des Integrators waren in Abb. 3b schwächer als in Abb. 3a, und auch die Atemfrequenz hatte abgenommen. Das ist wahrscheinlich nicht auf eine Hemmung des Atemzentrums durch Curare zurückzuführen, sondern auf eine spontane Abnahme seiner Aktivität. — Abb. 3c zeigt den Verlauf einer zentralen Lähmung nach 15 mg/kg Morphin: die Phrenicusentladungen gingen in Frequenz und Amplitude zurück und hörten nach etwa 2 min ganz auf. Lobelin (3 mg/kg) durchbrach diese Lähmung (Abb. 3d).

Bei der Wirkung von Morphin und Lobelin interessierten in diesem Versuch nur die Veränderungen am Atemzentrum. Die Muskelkontraktionen gaben nicht das normale Verhalten wieder, da sie noch unter dem Einfluß von Curare und Prostigmin standen. Normalerweise blieben die Kontraktionen des Zwerchfells während der ganzen Dauer der Inspiration auf der gleichen Höhe. In Abb. 3d jedoch reagierte das Zwerchfell auf die außerordentlich langgezogenen Impulssalven kurz nach der Injektion von Lobelin nur mit kurzen Zuckungen. Dieses Mißverhältnis zwischen elektrischer und mechanischer Aktivität ist keine Nachwirkung von Curare; dieses verminderte nur die Stärke der Kontraktionen, nicht ihre Dauer. Prostigmin reduzierte auch ohne vorherige Gabe von Curare die Kontraktionen wie in Abb. 3d auf kleine, kurz dauernde Zuckungen. Die Erklärung hierfür ist, daß Prostigmin erst während der Kontraktion durch Anhäufung von Acetylcholin die neuromuskuläre Übertragung hemmt.

Infolge der langen Salven und kurzen Pausen der Phrenicusentladungen unmittelbar nach Lobelin konnte sich der Integrator in den Atempausen nicht mehr vollständig entladen, bevor der nächste Atemzug einsetzte. Das führte zu einem mitunter sehr starkem Anstieg der Grundlinie. Langdauernde Atemzüge wie die ersten nach Lobelin in Abb. 3d verfälschen zudem die Integration. In Versuchen, die eine starke Anregung der Atmung erwarten lassen, wendet man daher besser folgende Modifikation des Verfahrens an: man hält die Zeitkonstante des RC-Gliedes möglichst groß, so daß die Impuls-Salven mehrerer aufeinanderfolgender Atemzüge gesammelt werden können, und entlädt den Sammler (C_2) in regelmäßigen Zeitabständen durch Kurzschluß. Bei diesem

Verfahren wird nicht die Aktivität des N. phrenicus bei jedem einzelnen Atemzug, sondern seine Aktivität über einen bestimmten Zeitraum summiert und als Maß für die Tätigkeit des Atemzentrums genommen.

Es kann sich die Frage ergeben, ob zentral atemlähmende Stoffe in höherer Konzentration auch die neuromuskuläre Übertragung beeinflussen. Man wird in diesem Fall nicht die spontanen Bewegungen der innervierten Zwerchfellhälfte, sondern ihre Kontraktionen bei elektrischer Reizung des peripheren Stumpfes des N. phrenicus registrieren und gleichzeitig die Aktionspotentiale vom linken N. phrenicus ableiten (Abb. 4). Diese Modifikation hat den Nachteil, daß durch elektrische Reizung des Nerven dessen physiologische Tätigkeit nicht genau nachgeahmt werden kann, so daß man nicht sicher ist, ob die beobachteten Wirkungen denjenigen bei physiologischer Innervation des Zwerchfells entsprechen. Es wurde z. B. beobachtet, daß nach 0,5 mg/kg Eserin bei einer Reizfrequenz von 60/sec noch ein Tetanus von annähernd gleichbleibender Stärke auftrat, bei einer Frequenz von 80/sec aber nur mehr eine kurze Zacke. Ob eine solche Wedensky-Hemmung eintritt, hängt also ganz von der Impuls-Frequenz im motorischen Nerven ab, die bei physiologischen Vorgängen keine konstante Größe ist. Man wird die Prüfung der neuromuskulären Übertragung durch elektrische Reizung des Nerven daher nur dann in Betracht ziehen, wenn man mit Benützung der physiologischen Innervation nicht auskommt.

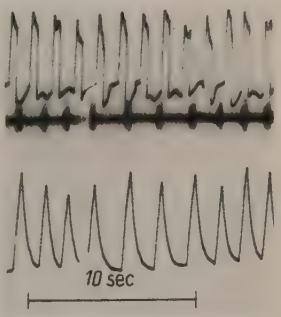


Abb. 4. Ratte, 200 g. *Kontraktionen des Zwerchfells bei elektrischer Reizung des N. phrenicus.* Darunter Aktionspotentiale des N. phrenicus und Integrator wie in Abb. 2. N. phrenicus mit maximaler Intensität und 150 Imp./sec gereizt

Über eine mit dem geschilderten Verfahren durchgeführte Untersuchung von Cholinesterase-Hemmern mit gleichzeitigen peripheren und zentralen Wirkungen auf den Atmungs-Apparat soll an anderer Stelle berichtet werden (Schaumann u. Job).

Zusammenfassung

In Versuchen an Ratten wurden die Aktivität des Atemzentrums und die Kontraktionen des Zwerchfells registriert und miteinander verglichen.

Als Maß für die Aktivität des Atemzentrums dienten die Entladungen des linken N. phrenicus, die oszillographisch registriert und elektronisch integriert wurden. Die Kontraktionen der rechten, innervierten Zwerchfellhälfte wurden mit einem mechano-elektrischen Transducer gemessen.

Mit dieser Methode ist es möglich, pharmakologische Wirkungen auf das Atemzentrum und auf die neuromuskuläre Übertragung gleichzeitig zu erfassen.

Literatur

De Candole, C. A., W. W. Douglas, C. Lovatt-Evans, R. Holmes, K. E. V. Spencer, R. W. Torrance and K. M. Wilson: Brit. J. Pharmacol. 8, 466 (1953).

Granit, R., and C. Job: J. Neurophysiol. **15**, 409 (1952).

Schaumann, W.: Arch. exper. Path. u. Pharmakol. (im Druck).

Schaumann, W., u. C. Job: J. Pharmacol. a. Exper. Ther. (im Druck).

Dr. C. Job, Innsbruck, Pharmakologisches Institut, Peter-Mayr-Str. 1,
Dr. W. Schaumann, Frankfurt/M., Pharmakol. Institut, Ludwig-Rehn-Str. 14

Arch. exper. Path. u. Pharmakol., Bd. 233, S. 261—270 (1958)

Aus dem Institut für Medizin und Biologie
der Deutschen Akademie der Wissenschaften zu Berlin, Arbeitsbereich Biochemie
(Direktor: Prof. Dr. Dr. K. Lohmann)

Die chemische Bestimmung von Digitoxin in Geweben und Ausscheidungen* **

Von

Kurt Repke

Mit 2 Textabbildungen

(Eingegangen am 11. November 1957)

Für Untersuchungen über Verteilung, Ausscheidung und Stoffwechsel von Digitoxin bei Tier und Mensch wurde eine Methode benötigt, welche neben ausreichender Spezifität, Empfindlichkeit und Genauigkeit einfach genug sein mußte, um Serienbestimmungen in größerem Umfang zu erlauben. Die bekanntgewordenen Verfahren schienen diesen Anforderungen nicht in jeder Beziehung gerecht zu werden.

Die quantitative Bestimmung von Herzglykosiden in Geweben und Ausscheidungen war bis vor wenigen Jahren nur mit Hilfe biologischer Methoden möglich. Dabei wurde die Herzwirkung am intakten Tier, am isolierten Herzen oder am Herz-Lungen-Präparat als Maßstab benutzt (Übersichten von Lendle; Weese; Rothlin). Die Bestimmungen gründeten sich also auf die charakteristische Wirkung dieser Stoffgruppe, stellten aber doch keine echte Analyse der untersuchten Substanz dar. — Dieser Vorbehalt ist auch gegenüber der in jüngerer Zeit eingeführten Bestimmung am embryonalen Entenherzen (Friedman u. Bine) zu machen. Immerhin wurden aber bei dem letztgenannten Verfahren gewisse Unsicherheiten der vorgenannten Techniken ausgeschaltet und eine weitaus höhere Empfindlichkeit erreicht. Das embryonale Herz als Testobjekt hat aber — offenbar wegen einiger Schwierigkeiten, welcher der Methode innewohnen — nur in wenigen Laboratorien Eingang gefunden. Die Ergebnisse können zudem durch herzaktive Verunreinigungen, welche in die untersuchten Extrakte übergehen, beeinflußt sein (Brown et al.).

In letzter Zeit ist ein bestimmtes Herzglykosid, nämlich Digitoxin, auch mit Hilfe einer radioaktiven Markierung des Moleküls quantitativ in biologischen Objekten bestimmt worden (Geiling et al., Turba u. Scholtissek). Dabei wurde also nicht das Glykosid direkt, sondern die Zahl der ausgesandten Impulse gemessen. Da die Impulse auch von Metaboliten oder Glykosidfragmenten ausgehen können, sind bei dieser Methode zur Erreichung schlüssiger Ergebnisse umständliche Fraktionierungen der Extrakte notwendig (Okita et al.). Die Anwendung des Verfahrens wird außerdem durch die schlechte Zugänglichkeit und die Kostspieligkeit der markierten Verbindung eingeschränkt.

* Herrn Professor Dr. Dr. K. Lohmann zum 60. Geburtstag gewidmet.

** Untersuchungen mit Herzsteroiden, 1. Mitteilung. — Ein Teil der Ergebnisse wurde am 14. 6. 1957 auf der 23. Tagung der Deutschen Pharmakologischen Gesellschaft in Freiburg (Breisgau) vorgetragen.

Die Nachteile der genannten Verfahren würden erwartungsgemäß einer Bestimmung der Herzglykoside mit chemischen Mitteln nicht anhaften. Die Forderung nach einer chemischen Methodik ist auch wiederholt, zuletzt von Bijlsma, erhoben worden. Die bisherigen Versuche in dieser Richtung haben jedoch immer wegen Mangel an genügend empfindlichen Methoden enttäuscht (Rothlin u. Bircher). Trotzdem wurden im Hinblick auf deren mögliche Vorteile erneut Versuche zur Entwicklung einer chemischen Methode für die Bestimmung von Herzsteroiden in biologischen Objekten angestellt, über welche hier berichtet wird.

Die erprobte Methodik stützt sich zunächst auf die Erfahrungen, welche bei der serienmäßigen Isolierung von Steroidhormonen gewonnen wurden [Repke (1)]. Ein wesentlicher Bestandteil des Verfahrens ist auch die Reinigung der Gewebsextrakte durch fraktionierte Adsorption an Aluminiumoxyd. Eine weitere Voraussetzung für den Erfolg war die Anwendung neuerer Bestimmungsverfahren, welche den Digitoxose-Anteil (Pesez) oder den Lakton-Ring [Repke (2)] des Digitoxins erfassen.

Methoden und Materialien

Im folgenden sind nur die Arbeitsgänge beschrieben, welche sich als Routineverfahren bei einer Serienuntersuchung bewährt haben [Repke (2)].

Homogenisieren der Untersuchungsobjekte. Das gekühlte Material wurde mit eiskalter, physiologischer Salzlösung im Verhältnis 1:10 bis 1:50 versetzt und dann, soweit notwendig, grob zerkleinert; anschließend unter Eiskühlung 3minutiges Homogenisieren bei höchster Tourenzahl im Gerät von E. Bühler (Tübingen). Dabei wurde eine feine, pipettierfähige Suspension erhalten. Nur bei der Haut konnte mit Hilfe dieses Geräts auch nach gründlicher Vorzerkleinerung und Verlängerung der Homogenisier-Dauer auf 5 min keine homogene Aufschwemmung erzielt werden. — Bei den Untersuchungen über das Ausmaß des Wiederfindens in biologischen Objekten wurden vor dem Ausschütteln 0,010 ml einer pyridinischen Digitoxinlösung mit 5 30 ml des betreffenden Homogenats oder der entsprechenden Flüssigkeit gründlich gemischt.

Ausschütteln der Homogenate. 5,0—30,0 ml der Suspension wurden 2mal hintereinander 5 min mit gereinigtem, äthanolfreien Chloroform ausgeschüttelt. Je nach Emulgierneigung des betreffenden Gewebes wurde dabei ein Verhältnis 1:3 bis 1:5 benutzt. Die Flüssigkeiten befanden sich während des Schüttelns in zylindrischen Glasgefäßen mit Normschliffstopfen und Ablaßhahn. Küken und Stopfen waren so gut eingeschliffen, daß Wasser als Dichtungsmaterial genügte. Die Abmessungen waren so gewählt, daß die Gefäße nicht mehr als halbvoll waren. Das Ausschütteln wurde auf einer für diesen Zweck konstruierten Maschine (Wendland) in waagerechter Lage ausgeführt (Frequenz: 120/min, Exkursion: 13 cm). Zu gleicher Zeit konnten darauf 6 Extraktionen vorgenommen werden.

Adsorption an Aluminiumoxyd[1]. Je nach Gewebsmenge wurden 5—10 g Al_2O_3 benutzt, welche in passend gewählte Glasröhrchen eingefüllt waren. Nach dem Waschen mit 10—20 ml Chloroform wurden die Säulen mit den Chloroform-Phasen beschickt, welche beim Ausschütteln erhalten worden waren. Der Durchlauf sowie weitere 10—20 ml Wasch-Chloroform wurden verworfen und dann mit 2mal 15—25 ml 2% Äthanol in Chloroform (Genin-Fraktion) und 2mal 15—25 ml 10%

[1] Aluminiumoxyd wurde nach meiner Kenntnis von Meyrat u. Reichstein zur Trennung von Herzglykosiden eingeführt. Eine gleichartige fraktionierte Elution wie die hier geübte ist schon von Okita et al. benutzt worden.

Äthanol in Chloroform (Digitoxin-Fraktion) eluiert. Das gesammelte Lösungsmittel-Gemisch wurde auf der Flamme (Mikrobrenner) bis auf einen geringen Rest abdestilliert, der im Wasserbad vertrieben wurde.

Xanthydrol-Reaktion. Ausführung nach Pesez. Das Reagens setzte sich aus 1,5 mg Xanthydrol, 15 ml Eisessig und 0,15 ml konzentrierter Salzsäure zusammen. Die Rückstände in den Destillierkölbchen wurden mit je 2,00 ml Reagens aufgenommen und die Kolben nach Verschluß mit Schliffstopfen genau 3 min im siedenden Wasserbad erhitzt. Zum Fixieren der Stopfen waren die Kölbchen dabei in ein Gestell eingespannt, das nach dem Prinzip des bekannten Weckapparates gebaut war. In den Lösungen entwickelte sich unter der Erhitzung eine mehr oder weniger intensive Rotfärbung. Vor dem Messen wurden die Kölbchen noch für 5 min in Eiswasser und für 10 min in Wasser von 20° getaucht, was zur Stabilisierung des Farbsalzes dienen sollte.

m-Dinitrobenzol-Reaktion[1]. Die Rückstände in den Destillierkölbchen wurden mit je 2,00 ml einer 0,5%igen Lösung von m-Dinitrobenzol in Pyridin aufgenommen und die erhaltenen Lösungen in 5 ml-Reagensgläser mit Schliff überführt. Nach dem Zumischen von je 0,05 ml n/10 NaOH wurden die Röhrchen in Dunkelheit für 5 min bei 25° gehalten. Vor dem Messen wurde in jeder Lösung noch ein kleiner Kristall Borsäure gelöst, wonach bei positiver Reaktion eine violette Farbe hervortrat.

Spektrophotometrie. Die Farblösungen und das Reagens wurden in Cuvetten mit 1 cm Lichtweg und knapp 2 ml Rauminhalt überführt. Die routinemäßigen Messungen (Farblösung gegen Reagens) wurden bei 546 mμ (Xanthydrol-Reaktion) oder bei 579 mμ (m-Dinitrobenzol-Reaktion) ausgeführt, wofür die entsprechenden Quecksilberlinien mit Hilfe von Metallinterferenz-Filtern (Schott u. Gen., Jena) isoliert waren. Die Meßanordnung bestand weiterhin aus einer Photozelle (Selen-Sperrschicht) und einem Skalengalvanometer von Zeiss (Jena). — Für die Aufnahme der Absorptionsspektren wurde das Universal-Spektrophotometer von Zeiss (Jena) benutzt, das vor den Messungen nachgeeicht worden war.

Chemikalien. Chloroform wurde vor der Benutzung zunächst mit konzentrierter Schwefelsäure so lange geschüttelt, bis die gegebenenfalls mehrfach gewechselte Säure farblos blieb. Nach dem Auswaschen der gelösten Säurereste wurde dann die Reinigung durch fraktionierte Destillation vervollständigt. Aluminiumoxyd für chromatographische Zwecke nach Brockmann (Feinchemie Eisenach) wurde vor der Verwendung gesiebt und nur diejenigen Anteile benutzt, welche das Sieb (2100 Maschen/cm², $\varnothing < 0{,}2$ mm) passierten. Die Reinigung von Pyridin und m-Dinitrobenzol wurde nach den Angaben von Wendland u. Lohmann vorgenommen. Das benutzte Xanthydrol war ein handelsübliches Präparat (Berlin-Chemie) mit einem Schmelzpunkt von 124°. Dowex 1 stammte von Dow Chemical Comp., Midland, Michigan, USA. Digitoxin und Digitoxigenin (Merck, Darmstadt[2]) waren papierchromatographisch einheitliche Präparate (System Xylol-Methyläthylketon 3:1/Formamid nach Kaiser).

Ergebnisse

Homogenisieren. An Leber und Haut wurde geprüft, nach welcher Zeitdauer des Homogenisierens eine optimale Digitoxin-Ausbeute gesichert ist. Den zu prüfenden Geweben war das Glykosid auf dem Blutweg zugeführt worden. Vor dem Beginn des Homogenisierens waren die

[1] Eine eingehendere Beschreibung der Kinetik der Farbsalzbildung und der Reaktion anderer Herzsteroide folgt in einer späteren Mitteilung.

[2] Herrn Dr. W. Küssner in Fa. E. Merck (Darmstadt) bin ich sehr zu Dank verpflichtet.

Leber grob und die Haut fein mit der Schere zerkleinert worden. Nach 1, 3 und 6 min Homogenisieren bei höchster Tourenzahl wurde ein aliquoter Teil der jeweiligen Suspension ausgeschüttelt und die gereinigten Extrakte auf ihren Digitoxingehalt geprüft. Dabei wurden keine Unterschiede in der jeweiligen Ausbeute festgestellt, so daß unter den Bedingungen des Routineverfahrens bei einer 3minutigen Homogenisierdauer ein Optimum an Sicherheit und Zeitaufwand erreicht sein dürfte.

Ausschütteln. Unter den gewählten Bedingungen wurden in der Regel nach der ersten Extraktion 78—82% und nach der zweiten weitere 8—11% des zugesetzten Digitoxins wiedergefunden. Ein drittes Ausschütteln brachte bei fast allen Homogenaten nur noch 2—4% der Einwaage, so daß darauf im Hinblick auf den erheblichen Mehraufwand an Zeit und Material verzichtet wurde. Nur beim Fettgewebe wäre ein drittes Ausschütteln vielleicht lohnend gewesen.

Reinigung und Fraktionierung. Die aus den Extrakten zu entfernenden Verunreinigungen waren darin zum Teil als Schwebekörperchen enthalten, die sich auch bei längerem Zuwarten nicht absetzten. Diese konnten mit Hilfe der Filtration durch Glaswolle nur in beschränktem Umfang entfernt werden. Die wirksamere Filtration durch feine Glasfritten erwies sich im Hinblick auf den erheblichen Zeitbedarf als unpraktisch. Schütteln der Extrakte mit dem Ionenaustauscher Dowex 1 (Gegenion: Cl) hatte nur einen geringen Reinigungseffekt; Digitoxin wurde dabei nicht gebunden.

Eine befriedigende Reinigung wurde erst durch Auftragen der Extrakte auf Aluminiumoxyd-Säulen erreicht. Zur Bindung der zu erwartenden minimalen Digitoxinkonzentrationen wären an sich recht kleine Mengen an Adsorbens ausreichend gewesen. Die angegebenen Mengen wurden jedoch im Hinblick auf eine möglichst vollständige Befreiung der Extrakte von Verunreinigungen für zweckmäßig gehalten. Die Schwebekörperchen blieben schon in den obersten Schichten der Säulen liegen. Der größte Teil der gelösten Verunreinigungen wurde entweder an der Säule nicht gebunden und lief daher mit dem Chloroform durch oder wurde so fest adsorbiert, daß er nicht in den interessierenden Fraktionen erschien.

Eingehendere Untersuchungen über den Reinigungseffekt des Aluminiumoxyds wurden mit Hilfe der Xanthydrol-Reaktion ausgeführt. Diese Desoxyzucker-Methode gibt zwar eine positive Reaktion mit der in allen Geweben vorhandenen Desoxyribose (Pesez), doch gehen erfaßbare Mengen davon nicht in die Extrakte über. Die teilweise recht hohen Leerwerte, welche in den ungereinigten Extrakten gefunden wurden (vgl. Tab. 1), beruhten vielmehr auf nicht identifizierten Verunreinigungen, welche uncharakteristisch-schmutzige Farben mit dem Reagens lieferten. Über das Ausmaß des erreichten Reinigungseffekts unterrichtet ein Vergleich zwischen den Leerwerten für die Extrakte mit und ohne Adsorption an Aluminiumoxyd (Tab. 1).

Tabelle 1. *Untersuchungen an Extrakten aus Geweben und Ausscheidungen mit Hilfe der Xanthydrol-Reaktion*

Optische Dichten (log i_0/i) 1. bei Kontrollbestimmungen (Leerwerte) ohne und mit vorangehender Reinigung der Extrakte und 2. bei Zusatz von je 10 μg Digitoxin zu den Homogenaten oder Flüssigkeiten mit anschließender Reinigung der Extrakte. Optische Dichte für 10 μg = 0,385. — 3. Ausbeute-Berechnungen. Bei den prozentualen Digitoxin-Ausbeuten wurde eine Streuung von $\pm$ 1 festgestellt

Untersuchungsobjekt	Extrahierte Menge[1] mg	1. Leerwerte		2. Digitoxinwerte	3. Ausbeuten %
		ungereinigt	gereinigt		
Blut	2000	0,086 ($\pm$ 0,037)[2]	0,000 ($\pm$ 0,001)	0,339	88
Dickdarm[3]	450	0,314 ($\pm$ 0,058)	0,000 ($\pm$ 0,001)	0,355	92
Dünndarm[3]	450	0,193 ($\pm$ 0,126)	0,002 ($\pm$ 0,002)	0,355	92
Fett	450	0,089 ($\pm$ 0,051)	0,001 ($\pm$ 0,001)	0,316	82
Gehirn	2700	0,277 ($\pm$ 0,276)	0,007 ($\pm$ 0,006)	0,354	92
Haut	450	0,125 ($\pm$ 0,051)	0,000 ($\pm$ 0,001)	0,342	89
Herz	250	0,070 ($\pm$ 0,033)	0,001 ($\pm$ 0,001)	0,362	94
Kot	450	0,660 ($\pm$ 0,240)	0,015 ($\pm$ 0,008)	0,351	91
Leber	450	0,091 ($\pm$ 0,043)	0,000 ($\pm$ 0,001)	0,340	88
Lunge	450	0,107 ($\pm$ 0,041)	0,001 ($\pm$ 0,001)	0,354	92
Magen[3]	450	0,310 ($\pm$ 0,134)	0,002 ($\pm$ 0,001)	0,342	89
Milz	450	0,073 ($\pm$ 0,020)	0,000 ($\pm$ 0,001)	0,353	92
Muskel	1400	0,023 ($\pm$ 0,006)	0,002 ($\pm$ 0,001)	0,358	93
Nebenniere	75	0,039 ($\pm$ 0,027)	0,002 ($\pm$ 0,001)	0,349	91
Niere	450	0,070 ($\pm$ 0,026)	0,002 ($\pm$ 0,001)	0,345	90
Ovar	75	0,025 ($\pm$ 0,011)	0,001 ($\pm$ 0,001)	0,343	89
Urin	4000	0,110 ($\pm$ 0,047)	0,016 ($\pm$ 0,010)	0,354	92

[1] Die angegebenen Mengen sind den Erfordernissen angepaßt, die sich bei einer Untersuchung über Verteilung und Ausscheidung von Digitoxin bei Ratten ergeben haben [Repke (2)].

[2] Die eingeklammerten Zahlen geben das Ausmaß der Streuung σ an $\left(\sigma = \pm\sqrt{\frac{\Sigma d^2}{n-1}}\right)$.

[3] Mit Inhalt.

Die Vorteile der Extraktreinigung wogen den Nachteil des erhöhten Zeitverbrauchs bei weitem auf. Die Xanthydrol-Reaktion beeindruckte an sich als recht spezifisch und außerdem wenig störanfällig. Trotzdem ließen sich auch bei Verwendung dieser Reaktion in einer Reihe von Objekten (besonders Gehirn, Darmtrakt und Kot) quantitative Bestimmungen wegen der starken Streuung der Leerwerte überhaupt erst nach vorangehender Reinigung der Extrakte vornehmen. Weiterhin lehrt ein Blick auf die entsprechende Spalte der Tab. 1, daß nach Extraktreinigung die getrennte Bestimmung eines Leerwertes für die meisten Gewebe als unnötig befunden werden kann. Schließlich ist noch erwähnenswert, daß Verunreinigungen die Farbreaktion zwischen Digitoxin und Xanthydrol hemmen können.

m-Dinitrobenzol gibt bekanntlich eine positive Reaktion nur mit denjenigen Verbindungen, welche aktiven Methylenwasserstoff enthalten. Derartige Verbindungen wie Ketosteroide, Kreatinin und andere werden nun vom Chloroform aus Geweben und Ausscheidungen in beträchtlichem Umfang mitextrahiert. Daher war für die Anwendbarkeit dieser Reaktion auf die Bestimmung von Digitoxin die Reinigung der Extrakte unerläßlich. Die fraktionierte Adsorption an Aluminiumoxyd zeigte sich auch hier als sehr nützlich. Die in Tab. 1 aufgeführten Untersuchungsobjekte hatten bei den angegebenen Mengen und Untersuchungsbedingungen Leerwerte (optische Dichten) zwischen 0,020 und 0,100, in der Regel jedoch um 0,050. Die höheren Werte wurden bei Dickdarm, Kot und Urin gefunden. Da die Extrakte also nicht vollständig von m-Dinitrobenzol-positiven Verunreinigungen befreit werden konnten, war bei der Digitoxin-Bestimmung mit dieser Probe die Berücksichtigung des jeweils gleichzeitig geprüften Leerwertes (Schnitt aus 3 Bestimmungen am korrespondierenden Gewebe von 3 verschiedenen Tieren) notwendig.

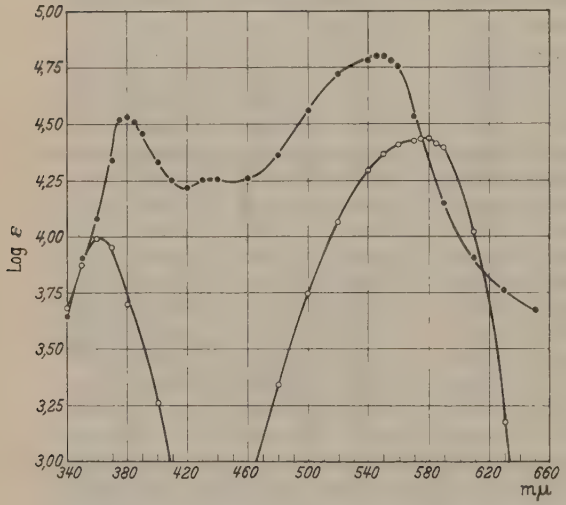


Abb. 1. Absorptionsspektren von den Farbsalzen der Xanthydrol- (•—•) und der m-Dinitrobenzol- (o—o)-Reaktion mit Digitoxin. Die untere Kurve erreicht zwischen 420 und 440 mμ den Nullwert. Die Berechnung des molaren Extinktionskoeffizienten ε bezieht sich bei beiden Reaktionen auf Digitoxin. $\varepsilon = \log i_0/i \left[\frac{\text{cm}^2}{\text{Mol}}\right]$

Die Auftragung der Gewebsextrakte auf Aluminiumoxydsäulen erlaubte neben der wichtigen Reinigung auch noch eine Fraktionierung der darin enthaltenen Herzsteroide. Beim Durchlauf der Extrakte wurde zunächst alles Digitoxin und Digitoxigenin adsorbiert und auch bei ausgiebigem Waschen mit Chloroform nicht abgelöst. Das Genin erschien dann bei der Elution mit 2%, das Glykosid erst mit 10% Äthanol in Chloroform. Unter Einhaltung des angegebenen Fraktionierungsschemas wurden zwar beide Steroide sicher getrennt und quantitativ wiedergefunden, jedoch reichte diese Fraktionierung zur vollständigen Abtrennung gewisser, dem Digitoxin nahestehender Metaboliten nicht immer aus. Mit Rücksicht auf ein quantitatives Wiederfinden wurde aber trotzdem an diesem Verfahren festgehalten, zumal die Anwesenheit derartiger Metaboliten leicht im

Papierchromatogramm erkannt werden konnte und ihr Anteil in der Regel nur wenige Prozent der gefundenen Digitoxinmenge betrug[1].

Spektrophotometrie. Nach TSCHESCHE u. Mitarb. liefert die Xanthydrol-Reaktion je nach der Natur der im Glykosid gebundenen Zucker unterschiedliche Farbsalze. Die Lage des Absorptionsmaximums bei der Digitoxose wurde von ihnen mit 526 mμ angegeben. — Unter den hier eingehaltenen Bedingungen wurde das Maximum des sichtbaren Bereichs beim Digitoxose-Glykosid Digitoxin zwischen 545 und 550 mμ gefunden (Abb. 1). Quantitative Bestimmungen bei 546 mμ ergaben eine lineare Proportionalität zwischen Digitoxinmenge und optischer Dichte (Abb. 2). — Das Absorptionsmaximum des bei der m-Dinitrobenzol-Reaktion gebildeten Farbsalzes wurde bei 580 mμ gefunden (Abb. 1); die Reaktion folgte dem Lambert-Beerschen Gesetz (Abb. 2).

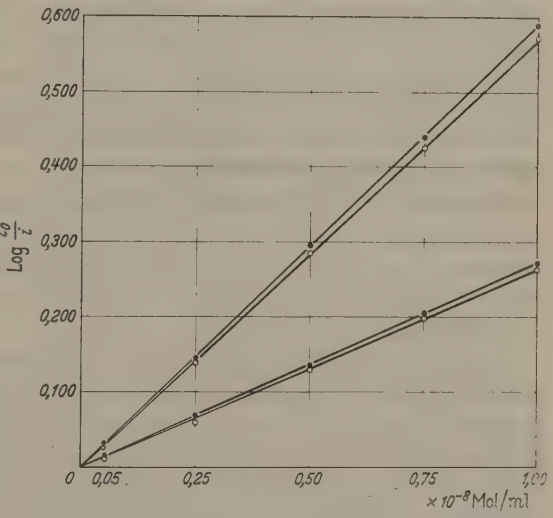


Abb. 2. Eichkurven für die Xanthydrol- (oberes Kurvenpaar) und die m-Dinitrobenzol-Reaktion (unteres Kurvenpaar). Jeweils eine Kurve wurde mit reinem (•—•) und mit extrahiertem (o—o) Digitoxin aufgenommen. Die Extraktion wurde an je 5 ml Muskelhomogenat (mit 450 mg Muskel) ausgeführt

Ausbeuten. Aus Tab. 1 geht hervor, daß bei 2maligem Ausschütteln durchschnittlich 90% des eingewogenen Digitoxins wiedergefunden wurden. Hervorzuheben ist, daß diese Ausbeute auch annähernd bei den niedrigen Digitoxin-Konzentrationen erreicht wurde (Abb. 2). Bei stärker fetthaltigen Geweben war die Ausbeute weniger günstig als bei fettarmen. Eine vorangehende Entfettung mit Petroläther erwies sich jedoch nicht als zweckmäßig, da hierbei bis zu 90% des eingewogenen Digitoxins verloren gingen. Die an einem vollständigen Wiederfinden fehlenden Prozente beruhten, abgesehen von Unvollständigkeiten der Extraktion, auf geringen Digitoxin-Verlusten während der weiteren Aufarbeitung, woran die Haftung an den Glasgefäßen, die Undichtigkeit von Schliffen und vor allem das Erhitzen beim Abdestillieren des Chloroforms beteiligt waren. Die Gesamtverluste wurden

[1] Über Digitoxin-Metaboliten soll in einer späteren Mitteilung berichtet werden.

bei der Analyse von Objekten mit unbekanntem Digitoxin-Gehalt durch Mitführung eines Digitoxin-Standards in gleichartigen Proben bestimmt und rechnerisch ausgeglichen.

Diskussion

Ein Vergleich zwischen den beiden benutzten chemischen Bestimmungsmethoden fällt unter den Bedingungen der Analyse von Geweben und Ausscheidungen zunächst zugunsten der Xanthydrol-Reaktion aus. Ihr wesentlicher Vorteil ist vor allem die weitgehende Spezifität, welche Störreaktionen schon nach der angewandten, einfachen Reinigung der Extrakte ausschließt. Ins Gewicht fällt aber auch im Hinblick auf die zu erwartenden minimalen Digitoxin-Mengen die etwa doppelt so große Empfindlichkeit der Xanthydrol- im Vergleich zur m-Dinitrobenzol-Reaktion[1]. Aus den angeführten Gründen dürfte die Xanthydrol-Probe bei Serienbestimmungen von Digitoxin in Geweben und Ausscheidungen zu bevorzugen sein. Trotz allem ist die m-Dinitrobenzol-Reaktion unentbehrlich. Das gilt zunächst für Identitätsprüfungen, da diese Probe die Intaktheit des für die Herzwirkung entscheidenden Butenolid-Ringes nachzuweisen gestattet. Nach der Trennung von Digitoxin an der Aluminiumoxyd-Säule erlaubt die Reaktion außerdem die Bestimmung von Digitoxigenin.

Abschließend soll versucht werden, ein erstes Urteil über die Leistungsfähigkeit der verschiedenen, zur Verfügung stehenden Methoden zu gewinnen. Die untere Erfassungsgrenze der Xanthydrol-Probe lag unter den beschriebenen Bedingungen bei 0,1 μg Digitoxin. Für das embryonale Entenherz wurde eine Empfindlichkeitsgrenze von 0,005 μg reinen Digitoxins angegeben (Bine u. Friedman); bei Anwendung dieser Bestimmungsmethode auf Extrakte aus Kot oder Urin erniedrigte sich diese bemerkenswerte Empfindlichkeit allerdings beträchtlich auf 2 oder gar 10 μg Digitoxin (George u. Mitarb.). Mit Hilfe der radioaktiven Markierung konnten dagegen sogar bis zu 0,02 μg Digitoxin in Harnextrakten nachgewiesen werden (Okita et al.). Unter dem Gesichtspunkt der Empfindlichkeit ist also die letztgenannte Methode unerreicht. Allerdings vermag sie nichts über die chemische Identität des bei der Impulszählung erfaßten Moleküls auszusagen; die damit erzielten quantitativen Bestimmungen sind daher mit einer gewissen Vorsicht zu bewerten. Die Testung am embryonalen Entenherzen gibt zwar über die Herzwirksamkeit der untersuchten Substanz Auskunft, stellt aber gleichfalls keine unzweideutige, quantitative Bestimmung von Digitoxin

[1] Die Überlegenheit der Desoxyzucker-Methode beruht darauf, daß dabei auf 1 Molekül Digitoxin immer gleich 3 Moleküle Digitoxose ins Spiel kommen. An sich hat das Farbsalz des m-Dinitrobenzols einen höheren molaren Absorptionskoeffizienten als das des Xanthydrols.

dar. Denn das dem Organismus einverleibte Glykosid konnte ja bis zu seiner biologischen Bestimmung durch Abwandlungen des Moleküls Wirkungsabschwächungen oder -steigerungen erfahren haben.

Der Vorzug der chemischen Methodik gegenüber den genannten Verfahren besteht darin, daß die Verwendung der gruppenspezifischen Reagentien neben der quantitativen Bestimmung auch durch einen Vergleich der Ergebnisse von beiden Proben die Anwesenheit der funktionell wichtigen Gruppen (Digitoxosekette und Laktonring) zu erkennen erlaubt. Wenn dann noch Fluorescenzmethoden hinzugenommen werden, welche Rückschlüsse auf die Struktur des Steroidkerns erlauben (Jensen), dann ist auch eine gewisse Voraussage über die biologische Aktivität der untersuchten Substanz möglich. Der Hauptvorzug der entwickelten chemischen Methodik im Vergleich zu den besprochenenVerfahren dürfte aber wohl in ihrer relativen Einfachheit und damit in ihrer Reproduzierbarkeit in jedem Laboratorium liegen. Die aufschlußreichsten Ergebnisse wären aber naturgemäß bei der wünschenswerten Kombination der chemischen mit der biologischen und physikalischen Methodik zu erreichen.

Zusammenfassung

In der vorliegenden Arbeit wird der Nachweis geführt, daß Digitoxin mit chemischen Mitteln in Geweben und Ausscheidungen quantitativ bestimmt werden kann. Die Methodik gründet sich zunächst auf ein Verfahren zur serienmäßigen Extraktion des Glykosids durch maschinelles Ausschütteln der entsprechenden Homogenate oder Flüssigkeiten mit Chloroform. Ein weiterer Bestandteil der Methodik ist die Reinigung und Fraktionierung der erhaltenen Extrakte durch Adsorption an Aluminiumoxyd. Zur quantitativen Bestimmung wird schließlich die Anwendung der Desoxyzucker-Reaktion mit Xanthydrol oder eines neuen Butenolid-Verfahrens mit m-Dinitrobenzol empfohlen. Die Leistungsfähigkeit der Methodik wird an Hand von Digitoxin-Bestimmungen in 17 verschiedenen Geweben und Ausscheidungen demonstriert. Hervorzuheben sind die Einfachheit der Methodik sowie die Spezifität und Empfindlichkeit (0,1 μg Digitoxin) der Xanthydrol-Reaktion.

Die Durchführung der Untersuchung wurde insbesondere von Herrn Prof. Dr. Dr. K. Lohmann gefördert. Weiterhin wird dankbar die verständnisvolle Mitarbeit von Frl. Sorma Klesczewski und Frl. Hannelore Stauske sowie Herrn Dipl.-Biol. H. J. Portius anerkannt.

Literatur

Bijlsma, U. G.: Ann. pharm. franç. **10**, 305 (1952).
Bine, R., and M. Friedman: Proc. Soc. exp. Biol. (N. Y.) **69**, 487 (1948).
Brown, B. F., D. Ranger and S. E. Wright: J. Pharmacol. exp. Ther. **113**, 353 (1955).

Friedman, M., and R. Bine: Proc. Soc. exp. Biol. (N. Y.) **64**, 162 (1947).
Geiling, E. M. K., F. E. Kelsey, A. Ganz, E. J. Walaszek, G. T. Okita, S. Fishman and L. B. Smith: Trans. Ass. Amer. Phycns **63**, 191 (1950).
George, S. St., R. Bine jr., M. Friedman and C. Bland: Proc. Soc. exp. Biol. (N. Y.) **78**, 504 (1951).
George, S. St., and M. Friedman: Circulation **6**, 851 (1952).
Jensen, K. B.: Acta pharmacol. (Kbh.) **9**, 99 (1953).
Kaiser, F.: Chem. Ber. **88**, 556 (1955).
Lendle, L.: Digitaliskörper und verwandte herzwirksame Glykoside (Digitaloide). Handbuch der experimentellen Pharmakologie, Ergänzungswerk **1**, 11 (1935). Berlin: Springer.
Meyrat, A., u. T. Reichstein: Pharm. Acta Helv. **23**, 135 (1948).
Okita, G. T., F. E. Kelsey, P. J. Talso, L. B. Smith and E. M. K. Geiling: Circulation **7**, 161 (1953).
Pesez, M. M.: Ann. pharm. franç. **10**, 104 (1952).
Repke, K.: (1) Naunyn-Schmiedeberg's Arch. exp. Path. Pharm. **230**, 178 (1957). — (2) In Vorbereitung.
Rothlin, E., u. R. Bircher: Ergebn. inn. Med. Kinderheilk., N. F. **5**, 457 (1954).
Tschesche, R., G. Grimmer u. F. Seehofer: Chem. Ber. **86**, 1235 (1953).
Turba, F., u. Ch. Scholtissek: Z. Physiol. Chem. **296**, 87 (1954). — Naunyn-Schmiedeberg's Arch. exp. Path. Pharm. **222**, 206 (1954).
Weese, H.: Digitalis. Leipzig: Thieme 1936.
Wendland, W.: Dissertation Humboldt-Universität. Berlin 1955.
Wendland, W., u. K. Lohmann: Biochem. Z. **328**, 420 (1957).

Doz. Dr. med. K. Repke, Institut für Medizin und Biologie der Deutschen Akademie der Wissenschaften zu Berlin, Arbeitsbereich Biochemie, Berlin-Buch, Lindenberger Weg 70

Arch. exper. Path. u. Pharmakol., Bd. 233, S. 271—283 (1958)

Aus dem Institut für Medizin und Biologie
der Deutschen Akademie der Wissenschaften zu Berlin, Arbeitsbereich Biochemie
(Direktor: Prof. Dr. Dr. K. Lohmann)

Verteilung, Ausscheidung und Stoffwechsel von Digitoxin bei der Ratte* **

Von
Kurt Repke

(Eingegangen am 22. November 1957)

Die älteren Untersuchungen über die Verteilung der Herzglykoside im Organismus des Warmblüters gipfelten in der Annahme, daß das Herz bis zu 12% der Dosis an sich zieht und pro Gewichtseinheit 8mal mehr Glykosid aufnimmt als die Bauchorgane und 25—37mal mehr als die nach Evisceration des Tieres verbleibenden Organe (Rothlin[21–23]; Übersichten von Lendle[18]; Weese[25–28]; Rothlin u. Bircher[23]). Auf diese Angaben gründet sich die Vorstellung, daß die bekannte Spezifität der Glykosidwirkung für das Herz auf der bevorzugten Anreicherung der Substanzen im Herzen beruht.

Bei den älteren Untersuchungen diente als Maß für die quantitative Bestimmung der Glykoside die Feststellung der Herzwirksamkeit am intakten Tier oder am Herzpräparat verschiedener Laboratoriumstiere. Die Angaben der älteren Untersucher sind neuerdings in wesentlichen Teilen durch die Beobachtungen der Forschergruppen um Friedmann[1,4,5,7,8] und um Geiling[3,6,19] in Frage gestellt worden. Als Bestimmungsmethode für die Herzglykoside diente diesen Autoren die Testung am embryonalen Entenherzen oder die Zählung der vom radioaktiv markierten Molekül ausgesandten Impulse. Diese neueren Methoden besitzen gegenüber den genannten älteren Verfahren den Vorteil einer weitaus größeren Empfindlichkeit. Aber auch bei diesen empfindlichen Methoden handelt es sich nicht um echte Analysen im chemischen Sinne, sondern um die Feststellung von Wirkungs- oder von Strahlungs-Äquivalenten der untersuchten Substanzen mit dem angewandten Herzglykosid. Rothlin u. Bircher[23] mahnen zur Vorsicht bei der Beurteilung der damit erhobenen Befunde, da gegen die Verläßlichkeit dieser Verfahren Einwände gemacht werden müssen und die Resultate der Untersuchungen untereinander in mancher Hinsicht nicht übereinstimmen.

In der vorliegenden Arbeit wird versucht, am Beispiel des Schicksals von Digitoxin bei der Ratte, die Klärung der geschilderten Situation zu fördern. Die Arbeit stellt eine methodisch unabhängige Nachprüfung und Erweiterung der Ergebnisse dar, welche mit den beiden in Rede

* Herrn Prof. Dr. Dr. K. Lohmann zum 60. Geburtstag gewidmet.

** Untersuchungen mit Herzsteroiden, 2. Mitteilung. Ein Teil der Ergebnisse wurde am 14. 6. 1957 auf der 23. Tagung der Deutschen Pharmakologischen Gesellschaft in Freiburg (Breisgau) vorgetragen.

stehenden Verfahren an der Ratte gewonnen worden sind (Fischer et al.[3] sowie Friedman et al.[5]). Zur quantitativen Bestimmung von Digitoxin wurde hier eine chemische Methodik (Repke[20]) benutzt. Besonderer Wert wurde auf die Identifizierung der untersuchten Substanz mit Digitoxin gelegt. Mit Rücksicht darauf erhielten die Ratten die verhältnismäßig hohe Dosis von 5 μg Digitoxin/g. Die Tiere wurden 0 Std (3 min), 3 Std und 12 Std nach der Injektion getötet und jeweils alle wichtigen Organe sowie die Ausscheidungen auf ihren Digitoxin-Gehalt untersucht. Aus dem Ergebnis der Analysen wurde eine Bilanz des Digitoxin-Stoffwechsels bei der Ratte gezogen.

Methoden und Materialien

Tiermaterial. Für die Untersuchung wurden weibliche Albino-Ratten vom Händler mit einem durchschnittlichen Gewicht von 115 ($\mp$ 30) g benutzt. Die Tiere erhielten vorwiegend aus Küchenabfällen bestehendes Futter und wurden 8 bis 14 Std vor Versuchsbeginn nüchtern gesetzt.

Digitoxin. Das benutzte Präparat* war papierchromatographisch einheitlich. Die Injektionslösung wurde durch Verdünnen (1:20) einer konzentrierten pyridinischen Stammlösung (5,00 mg/0,10 ml) mit einem 1:1-Gemisch von 1,8%iger NaCl-Lösung und Äthanol hergestellt; sie war bei Zimmertemperatur stabil. Die Kontrolltiere erhielten die gleiche Lösung ohne Digitoxin.

Injektionstechnik. Das Injektionsvolumen betrug 0,20 ml/100 g Ratte, was einer Dosierung von 5 μg Digitoxin/g entsprach. Nach Freilegung der V. jugularis in Äthernarkose wurde ohne weitere Narkose das berechnete Volumen in 3,0 min mit gleichmäßiger Geschwindigkeit injiziert. Danach wurden die Tiere bei den 3- und 12 Std-Versuchen in Stoffwechselkäfige gesetzt, wo sie ohne Nahrung blieben. 3 bis 5 Std nach der Injektion stellte sich zunehmend der schon von Gold et al.[9] beschriebene Vergiftungszustand ein, in dem alle Ratten, soweit sie so lange beobachtet wurden, im Verlauf von 10—90 Std zugrunde gingen.

Blutentnahme. Die Ratten wurden in Äthernarkose durch Entbluten (Punktion des rechten Ventrikels mit anschließender Blutaspiration in eine Citratlösung) getötet. Bei den 0 Std-Versuchen begann die Blutentnahme 2,5 min nach beendeter Digitoxin-Injektion, sie dauerte durchschnittlich 1 min.

Organpräparation. Die Tierleichen wurden bis zur vollständigen Präparation auf Eis gekühlt. Die Organe wurden bei der Entnahme sorgfältig von anhängendem Fett, Bindegewebe oder Blutgerinsel befreit. Die einzelnen Darmabschnitte wurden vor ihrer Trennung unter Belassung der Inhalte abgebunden. Von der Herzmuskulatur wurde der Kammerteil, von der Skeletmuskulatur der vorwiegend rote Anteil einer hinteren Extremität präpariert. Das untersuchte Fett stammte aus dem Bauchraum. Die Hautproben behielten das fest anhaftende Fettgewebe, wurden jedoch von den Haaren befreit. Die Hirne wurden mit Kleinhirn und Brücke entnommen. Die präparierten Organe wurden bis zur Aufarbeitung bei —20° gehalten.

Aufarbeitung. Die benutzte Methodik ist in einer vorangehenden Mitteilung (Repke[20]) beschrieben. Für die Digitoxin-Bestimmung wurde die Xanthydrol-Reaktion benutzt. Wenn ein sehr niedriger Digitoxingehalt zu erwarten war, wurden die Untersuchungsobjekte mehrerer Tiere zusammengefaßt. Bei Einsatz von

* Herrn Dr. W. Küssner in Fa. E. Merck (Darmstadt) bin ich sehr zu Dank verpflichtet.

2 Homogenisatoren und 2 Schüttelmaschinen benötigten 4 Personen für die Aufarbeitung einer Versuchsreihe von 6 Tieren (102 Objekte) etwa 4 Tage. Insgesamt wurden 12 solcher Reihen ausgeführt.

Papierchromatographie. Für die aus Harn isolierte Substanz wurde das System Benzol-Methylaethylketon (1:1)/Formamid, für alle übrigen Objekte das System Xylol-Methylaethylketon (3:1)/Formamid benutzt (KAISER[15]). Zum Nachweis der Substanzen auf dem Papier wurden die Chromatogramme mit 3,5-Dinitrobenzoesäure (TSCHESCHE et al.[24]), Antimonchlorid (LAWDAY[17]) sowie Trichloressigsäure-Chloramin (JENSEN[14]) behandelt. Mit diesen Reagentien war eine Prüfung der zu identifizierenden Substanzen auf Intaktheit des Laktonringes, Veränderungen des Steroidkerns und Vorhandensein der Digitoxosekette möglich.

Ergebnisse

Identitäts-Untersuchungen. Geprüft wurden die 12 Std nach Digitoxin-Injektion erhaltenen, über Al_2O_3-Adsorption gereinigten Materialien aller auch quantitativ analysierter Ausscheidungen und Gewebe mit Ausnahme von Haut und Fett. Die Identität der mit Hilfe der Xanthydrol-Reaktion quantitativ bestimmten Substanz wurde auf verschiedenen Wegen gesichert. Die Verwendung von Chloroform als Extraktionsmittel und vor allem die Fraktionierung der Extrakte an Aluminiumoxydsäulen gewährleisteten, daß sich in der letztlich untersuchten Fraktion nur Steroide befanden, welche in ihren physikalisch-chemischen Eigenschaften dem Digitoxin glichen. Das schließlich isolierte Material erwies sich bei der Papierchromatographie in den Systemen Xylol-Methyläthylketon (3 : 1)/Formamid oder Benzol-Methyläthylketon (1 : 1)/Formamid in der Regel in bezug auf den Steroidgehalt als praktisch einheitlich und zeigte die gleichen R_F-Werte wie authentisches Digitoxin. Weiter gab diese Substanz auf dem Papier mit 3,5-Dinitrobenzoesäure, Trichloressigsäure-Chloramin und Antimontrichlorid die charakteristischen Farb- und Fluorescenz-Reaktionen des Digitoxins. Nach allem handelt es sich bei der untersuchten Substanz um Digitoxin.

Wie schon angedeutet, reichte die Fraktionierung der Extrakte an Aluminiumoxyd-Säulen nicht immer zur völligen Abtrennung gewisser, dem Digitoxin nahestehender Verbindungen aus. Jedoch blieb der Gehalt der Digitoxin-Fraktion an diesen Digitoxin-Metaboliten zumeist an der Grenze der Nachweisbarkeit; nur beim Urin fanden sich trotz Fraktionierung überwiegend Metaboliten. Die Metaboliten unterschieden sich vom Digitoxin durch ihren stärker polaren Charakter, welchen sie durch Aufnahme einer weiteren OH-Gruppe in den Steroidkern oder durch Konjugation gewonnen hatten. Dagegen besaßen sie noch den Laktonring und die Digitoxosekette, also die funktionell entscheidenden Gruppen*. Diese Feststellung ließ schließen, daß die

* Näheres s. K. REPKE: Über Digitoxin-Metaboliten bei der Ratte (Naturwissenschaften, im Druck).

Tabelle 1. *Verteilung von Digitoxin in den ersten 12 Std nach intravenöser Injektion von 5 µg/g Ratte*

Die unter 0, 3 und 12 Std aufgeführten Zahlen stellen jeweils das arithmetische Mittel der an je 9 Tieren gewonnenen Werte dar. In Klammern ist das Ausmaß der Streuung σ angegeben $\left(\sigma = \pm \sqrt{\frac{\Sigma d^2}{(n-1)}}\right)$. Die angegebenen Objektwerte sind auf eine Ratte von 115 g und eine Digitoxin-Dosis von 575 µg umgerechnet. Für Fett wurden 5%, für Blut 7,5%, für Haut 15% und für Skeletmuskel 40% des Körpergewichts gerechnet

Untersuchungsobjekt	µg Digitoxin/g Gewebe			µg Digitoxin/Objekt			Prozent der Dosis		
	0 Std	3 Std	12 Std	0 Std	3 Std	12 Std	0 Std	3 Std	12 Std
Blut	7,2 (±0,7)	5,0 (±0,5)	2,8 (±0,6)	61,5 (±5,8)	43,1 (±4,6)	24,7 (±4,6)	10,7 (±1,0)	7,5 (±0,8)	4,3 (±0,8)
Dickdarm* . .	3,1 (±0,8)	5,7 (±1,1)	5,3 (±3,4)	8,1 (±2,9)	13,2 (±3,5)	10,4 (±6,9)	1,4 (±0,5)	2,3 (±0,6)	1,8 (±1,2)
Dünndarm* . .	7,5 (±2,0)	11,4 (±2,8)	16,6 (±5,2)	37,4 (±12,6)	47,2 (±16,1)	77,7 (±30,5)	6,5 (±2,2)	8,2 (±2,8)	13,5 (±5,3)
Fett	3,2 (±0,6)	3,9 (±0,6)	1,1 (±0,4)	19,0 (±3,5)	23,0 (±3,5)	6,9 (±2,3)	3,3 (±0,6)	4,0 (±0,6)	1,2 (±0,4)
Gehirn	0,7 (±0,2)	1,3 (±0,5)	1,2 (±0,5)	0,6 (±0,1)	1,7 (±0,6)	1,7 (±0,6)	0,1 (±<0,1)	0,3 (±0,1)	0,3 (±0,1)
Haut	4,1 (±0,9)	2,2 (±0,4)	1,3 (±0,6)	70,2 (±15,0)	38,5 (±5,8)	22,4 (±10,9)	12,2 (±2,6)	6,7 (±1,1)	3,9 (±1,9)
Herz	11,7 (±2,4)	7,3 (±1,4)	6,0 (±1,2)	4,6 (±0,6)	2,9 (±0,6)	2,3 (±0,6)	0,8 (±0,1)	0,5 (±0,1)	0,4 (±0,1)

* mit Inhalt

Kot	—	2,8 (±1,1)	15,7 (±3,0)	—	0,5 (±0,4)	5,2 (±4,6)	—	<0,1 (±<0,1)	0,9 (±0,8)
Leber	28,4 (±3,7)	18,6 (±2,4)	12,3 (±5,2)	134,9 (±18,4)	79,3 (±9,2)	59,8 (±28,2)	23,4 (±3,2)	13,8 (±1,6)	10,4 (±4,9)
Lunge	10,4 (±1,8)	7,1 (±0,8)	5,0 (±1,9)	7,5 (±1,7)	4,6 (±0,6)	3,4 (±1,2)	1,3 (±0,3)	0,8 (±0,1)	0,6 (±0,2)
Magen*	5,8 (±1,5)	4,1 (±1,4)	2,2 (±0,9)	10,4 (±4,0)	15,5 (±9,8)	3,4 (±1,1)	1,8 (±0,7)	2,7 (±1,7)	0,6 (±0,2)
Milz	7,2 (±0,9)	3,9 (±0,7)	3,0 (±1,3)	4,6 (±1,7)	1,7 (±0,6)	1,7 (±0,6)	0,8 (±0,3)	0,3 (±0,1)	0,3 (±0,1)
Muskulatur . .	2,9 (±0,5)	3,3 (±0,4)	1,8 (±0,5)	133,2 (±21,8)	156,9 (±17,2)	85,7 (±23,0)	23,2 (±3,8)	27,3 (±3,0)	14,9 (±4,0)
Nebennieren . .	85,3 (±0,6)	73,2 (±13,1)	66,6 (±13,1)	2,3 (±0,3)	2,3 (±0,6)	2,3 (±0,5)	0,4 (±<0,1)	0,4 (±0,1)	0,4 (±<0,1)
Nieren	16,4 (±1,7)	7,7 (±2,2)	5,1 (±1,6)	13,8 (±2,3)	6,9 (±1,7)	4,6 (±1,7)	2,4 (±0,4)	1,2 (±0,3)	0,8 (±0,3)
Ovarien	10,8 (±3,3)	7,0 (±1,2)	8,4 (±2,2)	0,6 (±0,2)	0,6 (±0,1)	0,4 (±0,1)	0,1 (±<0,1)	0,1 (±<0,1)	<0,1 (±<0,1)
Urin	—	5,7 (±4,0)	7,9 (±5,5)	—	5,2 (±3,5)	14,4 (±8,6)	—	0,9 (±0,6)	2,5 (±1,5)
Summe	—	—	—	508,7 (±90,9)	443,1 (±78,4)	327,0 (±126,0)	88,4 (±15,7)	77,0 (±13,6)	56,8 (±21,8)

* mit Inhalt

entsprechenden „Verunreinigungen" der Digitoxin-Fraktion noch die typische Herzwirkung besaßen. Daraus wurde die Berechtigung hergeleitet, diese Digitoxin-Derivate auch beim Urin, wo sie vor allem zahlenmäßig ins Gewicht fielen, als Digitoxin zu rechnen. — Die weitere Darstellung gründet sich auf die in Tab. 1 zusammengefaßten Ergebnisse.

Spezifische Verteilung. Die unmittelbar nach Injektion gefundene Digitoxin-Konzentration in den einzelnen Organen verdient besondere Aufmerksamkeit, da sie — noch unbeeinflußt von Zerstörung und Ausscheidung des Glykosids — deren wahre Affinität zum Digitoxin widerspiegelt. — Die weitaus höchste Digitoxinmenge pro Gewichtseinheit zog die Nebenniere an sich. Diese Fähigkeit beruht nicht auf dem allgemeineren Charakter der Nebenniere als steroidproduzierendes Organ, denn sie fehlte anderen Steroidproduzenten wie Eierstock und Hoden. — Mit weitem Abstand zur Nebenniere folgten die Leber und dann die Niere. Die besondere Konzentrierung in diesen Organen ist wohl mit deren Funktion als Ausscheidungsorgan in Zusammenhang zu bringen. Auch das Herz erwies sich noch zu einer gewissen Anreicherung des Glykosids aus dem Blut fähig, besaß jedoch keine Vorzugsstellung gegenüber Lunge und Ovar, welche alle etwa den gleichen spezifischen Gehalt zeigten. In Höhe des Blutspiegels wurde die Konzentration in Milz und Dünndarm gefunden; bei den übrigen Organen, darunter auch beim Skeletmuskel, lag sie mehr oder weniger beträchtlich darunter. Eine besonders niedrige Affinität zum Digitoxin zeigte das Gehirn.

3 Std später hatte der spezifische Gehalt fast aller Organe außer Darm erheblich abgenommen; nur Muskulatur, Fett und Gehirn hatten im Verlaufe dieser Stunden zusätzlich Digitoxin an sich gezogen. Die letztgenannten Gewebe besitzen offenbar nicht wie die übrigen die Fähigkeit, sich sogleich in Abhängigkeit von der jeweiligen Affinität mit dem auf dem Blutwege herangeführten Digitoxin ins Gleichgewicht zu setzen. — Insgesamt 12 Std nach der Injektion war die Digitoxin-Konzentration in allen Organen außer Darm weiter, wenn auch nicht so steil wie innerhalb der ersten 3 Std, abgefallen. Das Herz zeigte nicht mehr Fähigkeit als die Mehrzahl der anderen Organe, das einmal aufgenommene Digitoxin zurückzuhalten. Dagegen wurde der spezifische Gehalt in Nebenniere und Gehirn fast unverändert gefunden. Die Digitoxin-Konzentration in der Nebenniere lag jetzt um mehr als eine Zehnerpotenz höher als im Herzen. — Wie eine kurze Rechnung nach den in Tab. 1 enthaltenen Daten zeigt, stellte sich zumeist über die ganze Beobachtungszeit hin ein etwa gleichbleibendes, jeweils charakteristisches Verhältnis zwischen Höhe des Blutspiegels und jeweiliger Gewebskonzentration des Digitoxins her.

Prozentuale Verteilung. Der Hauptteil der eingespritzten Dosis entfiel erwartungsgemäß auf die Gewebe mit großer Masse. Die Skeletmuskulatur erreichte und überstieg so trotz ihres relativ niedrigen spezifischen Gehalts den Dosisanteil der Leber; beide vereinigten unmittelbar nach der Injektion fast 50% der injizierten Menge auf sich. Neben dem Blut zog auch die Haut einen nicht unbedeutenden Anteil auf sich. Im Laufe der Beobachtungszeit trat eine zunehmende Ansammlung des Digitoxins im Dünndarm hervor, während die im Dickdarm angetroffene Menge nur wenig zunahm. Über 1% beanspruchten außer den genannten Organen zunächst noch Fett, Nieren, Magen und Lunge für sich. Alle übrigen untersuchten Objekte, darunter auch das Herz, wiesen dauernd unter 1% auf. Die Ausscheidung in Harn und Kot erreichte innerhalb 12 Std nur wenig mehr als 3%, wovon der Harn die Hauptmenge stellte.

Schicksal im Organismus. Nach den skizzierten Beobachtungen kann folgendes Bild vom Schicksal des einverleibten Digitoxins entworfen werden. Unmittelbar nach der Injektion sättigte sich die Mehrzahl der Organe aus dem Blut mit Digitoxin ab. Nur etwa 10% der Dosis blieben zunächst im Blut zurück. Im Verlauf der ersten 3 Std nahm dann jedoch, dem Blutspiegel folgend, der Gehalt der meisten Organe ziemlich schnell ab. Ursache dafür waren die weitere Aufnahme von Digitoxin in Fett und Skeletmuskel, die Metabolisierung von Digitoxin sowie dessen gleichzeitige Ausscheidung in den Dünndarm. Die Ausscheidung erfolgte wahrscheinlich zum größten Teil über die Leber zusammen mit der Galle. Dies war aus der starken Abnahme des Lebergehalts zu schließen, die allerdings zum Teil auch auf Digitoxin-Umsetzung beruhte. Daneben gelangte ein kleinerer Teil wohl auch über andere Drüsen in den Darm. Dafür sprach die Feststellung, daß sich in dem während der Vergiftung reichlich abgesonderten Speichel Digitoxin nachweisen ließ. — In den nächsten 9 Std nahm die Digitoxinmenge in den Organen außer Darm weiter, wenn auch weniger schnell ab, wofür offenbar die Freisetzung des in Fett und Skeletmuskel gespeicherten Digitoxins sowie die Rückresorption von Digitoxin aus dem Darm verantwortlich waren. Diese Rückresorption ging aus der Beobachtung hervor, daß während der 12stündigen Beobachtungszeit die Digitoxinmenge im Dickdarm in nicht annähernder Weise der Zunahme im Dünndarm folgte. Als Ort der Rückresorption waren danach Ileum und Colon anzunehmen. Ins Blut gelangt sammelte sich das resorbierte Digitoxin letztlich wieder in der Leber, so daß ein enterohepatischer Kreislauf geschlossen war.

Die Gesamtmenge des nachweisbaren Digitoxins nahm in den 12 Std ziemlich stetig ab. Dem lag wahrscheinlich ein Um- und Abbau des Glykosids zugrunde. Als Stoffwechselorgan kam vor allem die Leber in Betracht. Diese Funktion der Leber war aus der Feststellung zu

erschließen, daß trotz immer erneuter Auffüllung des Vorrats aus den Geweben der Verlust der Leber an Digitoxin bedeutend größer als der Digitoxin-Gewinn von Darm und Kot war. Die im Organismus nachweisbare Digitoxinmenge hatte innerhalb 12 Std von 88 auf 57% der injizierten Dosis abgenommen. Im Vergleich dazu war die im gleichen Zeitraum mit Harn und Kot ausgeschiedene Menge mit 3% klein.

Besprechung

I.

In der folgenden Übersicht sind die Ergebnisse dieser Arbeit den Resultaten gegenübergestellt, welche mit Hilfe der Testung am embryonalen Entenherzen oder der Impulszählung nach Einspritzung von radioaktiv markiertem Digitoxin erhalten wurden. Aus dem Grad der angetroffenen Übereinstimmung soll versucht werden, ein Urteil über die Verläßlichkeit der neueren Methoden und damit einen Maßstab für die Bewertung der damit erzielten Ergebnisse zu gewinnen. Die Vergleichbarkeit der Resultate ist dadurch begrenzt, daß von den Voruntersuchern nur etwa die Hälfte der hier analysierten Organe untersucht wurde und daß recht unterschiedliche Dosierungen, zum Teil auch abweichende Untersuchungszeiten verwandt wurden. Für einen Vergleich eignet sich vor allem die prozentuale Aufteilung der jeweiligen Digitoxin-Dosis. In Tab. 2 sind die entsprechenden Werte für einige Organe zusammengestellt, soweit sie von Friedmann et al.[5] und Fischer et al.[3] geprüft wurden.

Ergänzend ist noch folgendes festzustellen. Von allen Untersuchern wurde eine verhältnismäßig langsame Elimination (Stoffwechsel plus Ausscheidung) gefunden. Ein Vergleich über die Umsatzraten des Digitoxins ist nicht möglich, da die Daten von Friedman et al.[5] wie von Fischer et al.[3] zur Aufstellung einer Bilanz nicht ausreichen. Übereinstimmend wurde von Fischer et al.[3], George et al.[7,8], Friedman et al.[4,5] sowie in dieser Arbeit festgestellt, daß bei der Elimination die Ausscheidung von Digitoxin mit Kot und Harn im Vergleich zu dessen Stoffwechsel eine untergeordnete Rolle spielt. — Von Friedman et al.[5]* wurde wie in dieser Arbeit gefunden, daß bei der Mehrzahl der Gewebe die Aufnahme von Digitoxin schon fast unmittelbar nach intravenöser Injektion beendet ist und daß nur Gehirn und Muskulatur ** im Verlauf der nächsten 3 Std noch weitere Glykosidmengen an sich ziehen. George et al.[7,8] haben schon vor dieser Arbeit wahrscheinlich gemacht, daß Digitoxin zum größeren Teil in der Leber umgesetzt und zum kleineren Teil mit der Galle ausgeschieden wird. Im Gegensatz zu den Schlußfolgerungen dieser Arbeit wurde von George u. Friedman[8] angenommen, daß Digitoxin nur mit der Galle in den Darmtrakt gelangt und daß das ausgeschiedene Digitoxin nur sehr wenig vom Darm rückresorbiert wird.

Aus Tab. 2 geht hervor, daß die mit Methodik (II) und (III) gewonnenen Ergebnisse am besten übereinstimmen. Die festzustellenden

* Fischer et al.[3] haben erst 1 Std, dann 6 und 24 Std nach der Injektion untersucht.

** Fettgewebe wurde von Friedman et al.[5] nicht untersucht.

Abweichungen dürften neben den schon erwähnten, unterschiedlichen Versuchsbedingungen wohl vor allem auf gewissen Schwächen der einzelnen Methoden beruhen.

Die Ergebnisse der Testung am embryonalen Entenherzen (FRIEDMAN et al.[5]) weisen wie alle biologischen Bestimmungen eine relativ große, methodisch bedingte Streuung auf. Die von FISCHER et al.[3] nach Einspritzung von radioaktiv markiertem Digitoxin ausgeführten Bestimmungen durch Impulsmessung sagen nichts über den chemischen Zustand und die biologische Wertigkeit des radioaktiven Materials aus. Die von den Autoren vorgenommene Trennung des Materials nach dem Löslichkeitsverhalten in Digitoxin (Chloroformphase) und biologisch inaktive Metaboliten (Wasserphase) ist unbefriedigend. Außerdem ist die Methodik mit der relativ niedrigen Wiederfindensquote von etwa 70% belastet. Bei der in dieser Arbeit benutzten, chemischen Bestimmung war das aus den Geweben und Ausscheidungen isolierte Digitoxin nicht ganz frei von Metaboliten.

Als Resultat des gebotenen Vergleichs zwischen 3 methodisch unabhängigen Untersuchungen ist festzustellen, daß neben manchen Abweichungen doch eine Reihe von prinzipiell wichtigen Fragen übereinstimmend beantwortet wurden. Das entworfene Bild von Verteilung und Ausscheidung des Digitoxins bei der Ratte dürfte daher wohl den wirklichen Verhältnissen nahegekommen sein. Das Ergebnis der vorliegenden Nachprüfung legt weiter den Schluß nahe, daß das gleiche Urteil auch für die mit Hilfe des Entenherz-Testes an Kaninchen und Hund (FRIEDMAN et al.[5]) sowie auch für die mittels radioaktiven Digitoxins an Katze (FISCHER et al.[3]) sowie Mensch (OKITA et al.[19]) erhaltenen Ergebnisse

Tabelle 2. *Vergleich der Ergebnisse verschiedener Methoden über die prozentuale Digitoxin-Verteilung bei der Ratte nach intravenöser Injektion*

Bestimmungsmethode	Dosierung µg/g	Zeit nach Injektion Std	Prozent der Dosis pro Organ								Wiedergefund. %
			Dickdarm	Dünndarm	Gehirn	Herz	Leber	Lunge	Magen	Milz	Muskel	Nieren	
(I) Radioaktivität	~0,15	1	0 (0)	0,9 (7,2)	— —	0,1 (0,1)	10,8 (16,6)	0,1 (0,1)	0 (1,0)	0 (0)	10,9 (10,9)	0,3 (0,4)	23,1 (36,3)
(II) Embryon. Entenherz . .	1,00	0	—	—	0	0,7	23,5	1,7	—	0,2	10,0	2,1	38,2
(III) Xanthydrol-Reaktion . .	5,00	0	1,4	6,5	0,1	0,8	23,4	1,3	1,8	0,8	23,2	2,4	61,7

(I) Nach FISCHER et al.[3]. In Klammern ist der Prozentsatz angegeben, der sich aus der Summe der Werte für Digitoxin und „wasserlösliche Digitoxin-Metaboliten" ergibt. — (II) Nach FRIEDMAN et al.[5]. Die Autoren geben nur den Digitoxin-Gehalt in µg/g Organ an. Die in der Tabelle erscheinenden Prozentwerte wurden nach den in dieser Arbeit (III) bestimmten, durchschnittlichen Organgewichten errechnet.

gilt. An allen diesen Untersuchungsobjekten war gefunden worden, daß wie bei der Ratte um 1% der Digitoxin-Dosis auf das Herz entfallen. Die bekannte, große Unempfindlichkeit des Rattenherzens gegenüber der Wirkung von Digitoxin (wie auch anderen Herzglykosiden) kann also nicht auf einer ungewöhnlich geringen Haftung des Glykosids am Rattenherzen beruhen. — Die älteren Untersucher, welche durch die Unempfindlichkeit der ihnen zu Gebote stehenden Methoden benachteiligt waren, hatten geschlossen, daß von einer Digitoxin-Dosis beim Hund 13,5% (Farah[2]), bei der Katze 6,25% (Weese[25–28]) oder 11,1% (Rothlin[21–23]) und beim Menschen gleichfalls 11% (Rothlin[21–23]) vom Herzen gebunden werden. Diese Zahlen müssen also jetzt als zu hoch angesehen werden. Die Vorstellung, daß der bei den meisten Tierarten sowie beim Menschen vorhandenen Spezifität der Glykosidwirkung für das Herz eine besondere Anreicherung des Glykosids im Herzen zugrunde liegt, ist danach nicht mehr aufrechtzuerhalten. Diese gewöhnliche Herzspezifität dürfte vielmehr auf einer spezifischen Ansprechbarkeit des Herzmuskels für das Glykosid beruhen.

II.

Im Zusammenhang mit den Ergebnissen dieser Arbeit sind noch weitere, wichtige Fragen des Digitoxin-Schicksals im Organismus zu erörtern.

Über die Verweildauer intravenös injizierten Digitoxins im Blut sind schon mehrere, sich allerdings widersprechende Feststellungen getroffen worden. Beispielsweise fanden Hatcher u. Eggleston[11] 5 min nach der Injektion von über 4 mg keine Spur mehr im Blut der Ratte. Auch Weese[26–28] schloß (nach Versuchen an der Katze), daß ein „Glykosid-Kreislauf" nicht zustande kommt. Vielmehr sei alles Glykosid, welches das Herz einmal mit dem Aortenblut verlassen habe, für das Herz verloren, da es augenblicklich in der Peripherie abgefangen würde. Im Gegensatz dazu wiesen Haferkorn u. Lendle[10] einen solchen „Glykosid-Kreislauf" nach, indem sie bei digitoxinbehandelten Katzen noch einige Minuten nach der intravenösen Injektion durch Aderlaß einen beträchtlichen Teil der injizierten Dosis entfernen konnten. Die Untersuchungen von Friedman et al.[5], Bine u. Friedman[1] sowie diese Arbeit haben gezeigt, daß Digitoxin nach intravenöser Injektion bei der Ratte zwar von der Mehrzahl der Organe schnell fixiert wird, das Glykosid jedoch noch lange im Blut nachgewiesen werden kann. Okita et al.[19] haben auch für den Menschen die Existenz eines „Glykosid-Kreislaufs" gesichert.

Über die Geschwindigkeit des Digitoxin-Stoffwechsels bei der Ratte liegen in der Literatur weit auseinandergehende Angaben vor. Als Maß für eine etwaige Entgiftung wurde dabei die Toleranz-Steigerung benutzt, welche bei zunehmender Verlangsamung der Infusionsgeschwindigkeit eintreten kann. Heubner u. v. Nyáry[12] fanden die Digitoxin-Toxicität innerhalb 10—200 min von der Geschwindigkeit der Infusion unabhängig. Im Gegensatz dazu hat v. Kaulla[16] bei gleichartiger Versuchstechnik auf eine Digitoxin-Entgiftung bis zu 7 μg/g Ratte/Std geschlossen.

In dieser Arbeit wurde gefunden, daß in 12 Std nur etwa 1,6 μg/g Ratte umgesetzt werden. Diese Angabe hat aber nur orientierenden Charakter, denn die Geschwindigkeit des Digitoxin-Stoffwechsels ist wahrscheinlich nicht konstant. Vielmehr ist zu vermuten, daß ähnlich wie

bei einer Reaktion erster Ordnung diese Geschwindigkeit in Abhängigkeit von der jeweils herrschenden Konzentration an Digitoxin regelmäßig abnimmt. — Der Digitoxin-Stoffwechsel ist noch in Beziehung zum Vergiftungsablauf nach Injektion von 5 μg Digitoxin/g Ratte zu betrachten. Obgleich sich 12 Std nach der Einspritzung schon 40% der ursprünglich gefundenen Digitoxinmenge nicht mehr im Körper nachweisen ließen, hatte erst zu dieser Zeit die Vergiftung den Höhepunkt erreicht. Diese Feststellung könnte so gedeutet werden, daß Digitoxin im Sinne einer Giftung umgesetzt wurde. Jedoch muß auch die Möglichkeit beachtet werden, daß die Vergiftungserscheinungen nicht auf einen Metaboliten des Digitoxins zurückgehen, sondern auf einer durch Digitoxin selbst erzeugten, biochemischen Veränderung beruhen, welche etwa 12 Std zu ihrer vollen Entwicklung benötigt.

Im Bild der Digitoxin-Vergiftung bei der Ratte spielt bei der gewählten Dosierung eine Herzwirkung keine oder nur eine untergeordnete Rolle; im Vordergrund stehen vielmehr Lähmung der Muskulatur im Wechsel mit Krämpfen (genauere Beschreibung bei Gold et al.[9]). Dieser spezifischen Wirkung auf das Zentralnervensystem steht die in dieser Arbeit gemachte Beobachtung gegenüber, daß die Digitoxin-Konzentration im Gehirn die niedrigste unter allen untersuchten Geweben war. Die spezifische Wirkung kann also auch in diesem Fall nicht auf eine spezifische Ansammlung des Glykosids im Erfolgsorgan zurückgeführt werden.

Diese Feststellung veranlaßt zur besonderen Vorsicht bei der Deutung der in dieser Arbeit festgestellten, auffallenden Anreicherung des Digitoxins in der Nebenniere der Ratte. Obgleich sich in der Literatur vielfache Hinweise auf eine Beziehung zwischen der Glykosidwirkung und der Nebennieren-Rinde finden, sollen vor einer Bewertung des Anreicherungsphänomens weitere Untersuchungen abgewartet werden. Die naheliegende Vermutung, daß die Anhäufung in der Nebenniere durch strukturelle Verwandtschaft zwischen Digitoxin und den Hormonen der Nebennieren-Rinde erklärt sei, kann allerdings wohl schon jetzt abgelehnt werden. Denn ein Molekül ohne eine solche Verwandtschaft, nämlich p-Acetamino-benzaldehyd-thiosemicarbazon („Conteben") sammelt sich in ähnlicher Weise wie Digitoxin in der Nebenniere an (Hinrichs et al.[13]).

Zusammenfassung

In der vorliegenden Arbeit wird mittels einer chemischen Methodik das Schicksal intravenös injizierten Digitoxins bei der Ratte verfolgt. Besonderer Wert wird dabei auf die Identifizierung der über die Xanthydrol-Reaktion quantitativ bestimmten Substanz mit Digitoxin gelegt. Die Beobachtungen über Verteilung und Ausscheidung bestätigen mehr

oder weniger weitgehend die Resultate, welche zuvor von amerikanischen Autoren mit Hilfe anderer Methoden (Bestimmung am embryonalen Entenherzen oder über radioaktives Digitoxin) gewonnen worden sind. Die beste Übereinstimmung zeigen die mittels der Testung am embryonalen Entenherzen und der chemischen Methodik erhaltenen Ergebnisse. Aus dem Resultat der Nachprüfung wird geschlossen, daß die genannten, neueren Bestimmungsverfahren zwar noch gewisse Schwächen besitzen, jedoch grundsätzliche Zweifel an ihrer Brauchbarkeit nicht begründet sind.

Über diese Nachprüfung hinaus bringt diese Arbeit noch folgende Resultate. Von den 14 untersuchten Geweben zeigt die Nebenniere mit Abstand die größte Speicherungsfähigkeit für Digitoxin. Das Herz weist keine Vorzugsstellung in der Affinität zum Digitoxin auf und zeigt auch keine besondere Fähigkeit, das einmal aufgenommene Glykosid zurückzuhalten. Die weitaus niedrigste Digitoxin-Konzentration wird im Gehirn gefunden. Bei der Mehrzahl der Gewebe ist über die ganze Beobachtungszeit (12 Std) hin ein etwa gleichbleibendes, jeweils charakteristisches Verhältnis zwischen Höhe des Blutspiegels und Gewebskonzentration des Glykosids festzustellen. — Bei der prozentualen Aufteilung der Digitoxin-Dosis entfällt der Hauptanteil auf Skeletmuskel und Leber. Wesentliche Glykosidmengen enthalten daneben noch Blut sowie Haut und im weiteren Verlauf auch der Dünndarm. Der Anteil des Herzens bleibt dauernd unter 1% der Dosis.

Aus den gemachten Beobachtungen ist auf die Existenz eines enterohepatischen Kreislaufs des Digitoxins und auf die Leber als Hauptorgan des Digitoxin-Stoffwechsels zu schließen. Eine Bilanz ergibt, daß innerhalb 12 Std die im Körper nachweisbare Glykosidmenge von 88% auf 57% abnimmt. Nur 3% der Dosis werden im gleichen Zeitraum mit Harn und Kot ausgeschieden. Zunächst bleibt unentschieden, ob die dem Nachweis entzogene Menge im Sinne einer Giftung oder Entgiftung umgesetzt wird. — Die Ergebnisse werden vor allem unter dem Gesichtspunkt etwaiger Beziehungen zwischen Spezifität der Wirkung und spezifischer Verteilung des Digitoxins diskutiert.

Die Durchführung dieser Untersuchung wurde insbesondere von Herrn Prof. Dr. Dr. K. Lohmann gefördert. Weiterhin wird dankbar die verständnisvolle Mitarbeit von Frl. Sorma Klesczewski und Frl. Hannelore Stauske sowie Herrn Dipl.-Biol. H. J. Portius anerkannt.

Literatur

[1] Bine, R., and M. Friedman: Circulation **1**, 1182 (1950).
[2] Farah, A.: J. Pharmacol. exp. Ther. **86**, 101 (1946).
[3] Fischer, C. S., A. Sjoerdsma and R. Johnson: Circulation **5**, 496 (1952).
[4] Friedman, M., R. Bine jr. and S. O. Byers: Proc. Soc. exp. Biol. (N. Y.) **71**, 406 (1949).

[5] Friedman, M., S. St. George, R. Bine, S. O. Byers and C. Bland: Circulation **6**, 367 (1952).
[6] Geiling, E. M. K.: Med. Ann. D. C. **20**, 197 (1951).
[7] George, S. St., R. Bine and M. Friedman: Circulation **6**, 661 (1952).
[8] George, S. St., and M. Friedman: Circulation **6**, 851 (1952).
[9] Gold, H., W. Modell, M. Cattell, J. G. Benton and E. W. Cotlove: J. Pharmacol. exp. Ther. **91**, 15 (1947).
[10] Haferkorn, M., u. L. Lendle: Naunyn-Schmiedeberg's Arch.exp.Path.Pharmak. **175**, 248 (1934).
[11] Hatcher, R. A., u. C. Eggleston: J. Pharmacol. exp. Ther. **12**, 405 (1919).
[12] Heubner, W., u. A. v. Nyáry: Naunyn-Schmiedeberg's Arch. exp. Path. Pharmak. **177**, 60 (1935).
[13] Hinrichs, K., H. Poppe u. H. Steyer: Naunyn Schmiedeberg's Arch. exp. Path. Pharmak. **221**, 6 (1954).
[14] Jensen, K. B.: Acta pharmacol. (Kbh.) **9**, 99 (1953).
[15] Kaiser, F.: Chem. Ber. **88**, 556 (1955).
[16] Kaulla, K. N. v.: Naunyn Schmiedeberg's Arch. exp. Path. Pharmak. **194**, 179 (1940).
[17] Lawday, D.: Nature (Lond.) **170**, 415 (1952).
[18] Lendle, L.: Digitaliskörper und verwandte herzwirksame Glykoside (Digitaloide). Handbuch der experimentellen Pharmakologie, Ergänzungswerk **1**, 11. Berlin: Springer 1935.
[19] Okita, G. T., P. J. Talso, J. H. Curry jr., F. D. Smith jr. and E. M. K. Geiling: J. Pharmacol. exp. Ther. **113**, 376 (1955); **115**, 371 (1955).
[20] Repke, K.: Naunyn Schmiedeberg's Arch. exp. Path. Pharmak. (im Druck).
[21] Rothlin, E.: Helv. med. Acta **1**, 460 (1934).
[22] Rothlin, E.: Schweiz. med. Wschr. **1944**, 217.
[23] Rothlin, E., u. R. Bircher: Ergebn. inn. Med. Kinderheilk., N. F. **5**, 457 (1954).
[24] Tschesche, R., G. Grimmer u. F. Seehofer: Chem. Ber. **86**, 1235 (1953).
[25] Weese, H.: Naunyn Schmiedeberg's Arch. exp. Path. Pharmak. **135**, 228 (1928).
[26] Weese, H.: Naunyn Schmiedeberg's Arch. exp. Path. Pharmak. **141**, 329 (1929).
[27] Weese, H.: Naunyn Schmiedeberg's Arch. exp. Path. Pharmak. **175**, 754 (1934).
[28] Weese, H.: Digitalis, Leipzig: Thieme 1936.

Doz. Dr. med. K. Repke, Institut für Medizin und Biologie der Deutschen Akademie der Wissenschaften zu Berlin, Arbeitsbereich Biochemie, Berlin-Buch, Lindenberger Weg 70

Arch. exper. Path. u. Pharmakol., Bd. 233, S. 284—295 (1958)

Aus der Medizinischen Universitätspoliklinik, Bonn
(Direktor: Prof. Dr. med. F. Tiemann)

Über den Einfluß von Cortison und Schilddrüsenhormonen auf die Serumproteine

Von
Hans-Ludwig Krüskemper

Mit 2 Textabbildungen

(Eingegangen am 30. Oktober 1957)

Die vorliegenden Untersuchungen beschäftigen sich mit dem Problem der Beziehungen zwischen Schilddrüsen- und Nebennierenrinden-Hormonen in ihrer Wirkung auf Stoffwechselvorgänge. Im Prinzip wurde so vorgegangen, daß bei den Versuchstieren durch hochdosierte Gaben von Schilddrüsenhormonen (Thyroxin und Trijodthyronin) eine experimentelle Hyperthyreose erzeugt und der Einfluß von Cortison auf die Entwicklung der hyperthyreotischen Stoffwechselveränderungen (gemessen am Verhalten der Serumeiweiß-Fraktionen) geprüft wurden. Bei dieser Versuchsanordnung ist eine Einflußnahme der betreffenden glandotropen Hormone des Hypophysenvorderlappens nicht anzunehmen, weil sowohl die Thyreotropin- als auch die ACTH-Synthese bzw. -Ausschüttung gehemmt ist.

Die zum Thema dieser Arbeit geäußerten Ansichten anderer Autoren (Bachmann, 1954; Greenberg u. Aterman, 1955) ergeben ebensowenig wie die Resultate eigener Untersuchungen (1955 a, b) ein einheitliches Bild. Es wurden sowohl Antagonismen, als auch Synergismen und sogar Potenzierungen von Schilddrüsen-Hormonwirkungen im Stoffwechsel durch Cortison (bzw. umgekehrt) beschrieben.

An einem weiteren Modell, dem Verhalten der Serumeiweiß-Fraktionen wurde daher das oben genannte Problem der gegenseitigen Beziehungen von Schilddrüsen- und Nebennierenrinden-Hormonwirkungen im peripheren Stoffwechsel untersucht. Eine Übersicht über das Verhalten sehr verschieden gearteter Stoffwechselprozesse zu gewinnen, besitzt nicht nur rein theoretisches Interesse, sondern trägt auch zur kritischen Diskussion der klinisch-praktischen Anregung, Hyperthyreosen mit Corticoiden zu behandeln, bei.

Methodik

Als *Versuchstiere* dienten männliche Albino-Inzuchtratten mit einem Durchschnittsgewicht von 150 g, die bei einer Standarddiät (nach Bahner, Hersteller: Fa. Latz, Euskirchen) gehalten wurden. Trinkflüssigkeit: Wasser ad libitum.

Der Gesamteiweißgehalt im Serum wurde refraktometrisch ermittelt.

Die Trennung der Eiweißfraktionen geschah mit Hilfe der Mikro-Elektrophorese-Apparatur nach Antweiler (1949). Dabei wurden die Seren mit dem von Longsworth (1942) angegebenen Puffer (p_H 8,6) auf eine Konzentration von etwa 2,0 g-% gebracht. Bei einer Spannung von 110 V und einer Stromstärke von 3,5 *mA* erwiesen sich 18 min als die optimale Trennungszeit.

Die Auswertung wurde nach Hartmann u. Schumacher (1950) vorgenommen.

Die Tötung der Versuchstiere erfolgte 24 Std nach der letzten Hormoninjektion. Sämtliche Hormone wurden subcutan verabfolgt.

Die statistische Prüfung der Ergebnisse wurde nach Pätau (1943) durchgeführt. Angegeben wird jeweils die Wahrscheinlichkeit p für die Homogenität der Mittelwerte der verglichenen Gruppen ($p = > 0{,}05$: nicht signifikant; $p = 0{,}05$—$0{,}01^{+}$: schwach signifikant; $p = 0{,}01$—$0{,}001^{++}$: signifikant; $p = < 0{,}001^{+++}$: hochsignifikant).

Über die Versuchsanordnung orientiert die folgende Texttabelle. Die Gruppenbezeichnungen kommen gekürzt in Text, Tabellen und Abbildungen zur Anwendung. Versuchsdauer 7 Tage.

Gruppe 1: Kontrollen, unbehandelt.
Gruppe 2: Thyroxin (0,05 mg/100 g/Tag).
Gruppe 3: Thyroxin (0,25 mg/100 g/Tag).
Gruppe 4: Trijodthyronin (TJT) (0,05 mg/100 g/Tag).
Gruppe 5: Cortison (2,0 mg/100 g/Tag).
Gruppe 6: Thyroxin (0,05 mg/100 g/Tag) + Cortison (siehe oben).
Gruppe 7: Thyroxin (0,25 mg/100 g/Tag) + Cortison (siehe oben).
Gruppe 8: TJT (0,05 mg/100 g/Tag) + Cortison (siehe oben).

Verwendet wurden folgende Hormonpräparate: Thyroxin (Roche), Cortisonacetat (Hoechst). Das Trijodthyronin wurde zur Verfügung gestellt durch die Fa. Hoechst A.G.

Ergebnisse

Wie bereits früher beschrieben (Kleinsorg, Krüskemper, Lopez, 1955), ließen sich acht Fraktionen deutlich unterscheiden, von denen eine als den Albuminen, zwei den α-Globulinen, drei den β-Globulinen und die restlichen zwei den γ-Globulinen zugehörig betrachtet wurden. Diese Zuordnung der Fraktionen fand bei papierelektrophoretischer Analyse ihre Bestätigung. Da über die Häufigkeit und die physiologische Bedeutung der eingezeichneten Unterfraktionen nichts Näheres bekannt ist, wurde von einer genaueren Auswertung dieser Unterfraktionen abgesehen. Ein Vergleich mit dem Elektrophoresediagramm beim Menschen zeigt, daß bei Ratten die β-Globulinfraktion sowohl relativ als auch absolut größer ist. Die übrigen Fraktionen entsprechen in ihrer Verteilung etwa den Verhältnissen beim Menschen.

Das Verhalten des *Gesamteiweiß-Gehaltes* im Serum ist in Abb. 1 graphisch dargestellt. Thyroxin in relativ geringer Dosierung (0,05 mg/100 g/Tag) bewirkte während der Versuchsdauer keine nachweisbare Änderung; eine Steigerung der Thyroxindosis führte hingegen zu einem deutlichen Absinken des Wertes (um etwa 10%) von 7,99 auf 7,26 g-% im Mittel. Dieser Effekt wurde in fast gleichem Ausmaß nach Behandlung mit TJT beobachtet, woraus sich ergibt, daß TJT hier ebenso stark wirksam war wie die fünffache Thyroxindosis (siehe Tab. 1).

Im Gegensatz zu der Verminderung des Serumeiweiß-Gehaltes unter Thyroxin bzw. TJT kam es nach Behandlung mit Cortison zu einem erheblichen Anstieg, der bereits nach 7 Tagen fast 25% (von 7,99 auf 9,81 g-%) betrug; diese Eiweißzunahme im Serum nach Cortison konnte gegenüber der Norm sehr gut gesichert werden.

Bei kombinierter Applikation von Cortison und Schilddrüsenhormonen ergaben sich Befunde, die von Art und Dosierung des jeweils verwendeten Schilddrüsenhormons abhängig waren. Nach 0,05 mg Thyroxin + Cortison blieb der Gesamteiweißgehalt gegenüber dem nach alleiniger Cortison-Zufuhr unverändert (9,59 g-% bzw. 9,81 g-%), d. h. es kam zu einem etwa zwanzigprozentigen Anstieg gegenüber der Norm. Statistisch bestand keine Differenz zur Cortisongruppe, gute Signifikanz jedoch gegenüber der Kontrollgruppe.

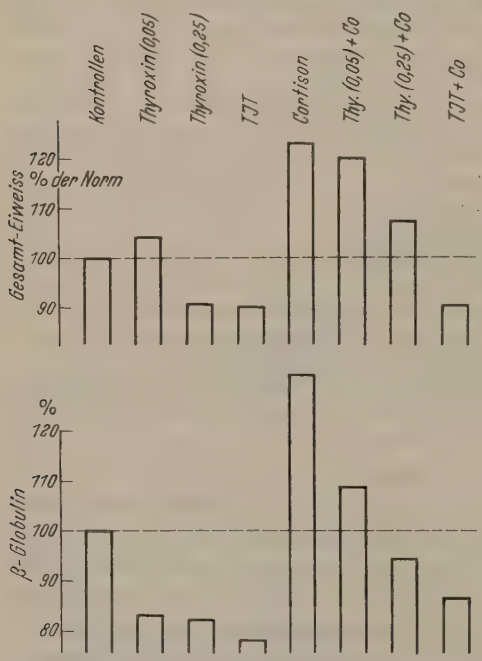


Abb. 1. Das Verhalten von Gesamteiweiß und β-Globulin (Absolutwerte) im Serum von Ratten nach Behandlung mit Thyroxin, Trijodthyronin, Cortison, Thyroxin + Cortison und Trijodthyronin + Cortison

Nach Behandlung mit der Kombination 0,25 mg Thyroxin + Cortison ergab sich für das Gesamteiweiß keine sichere Abweichung von der Norm (8,56 g-%; + 7%). Dieser Wert war von dem der Gruppe 0,05 mg Thyroxin + Cortison signifikant verschieden. Dieses von der Schilddrüsenhormon-Dosis abhängige Absinken des Gesamteiweißgehaltes im Serum trotz gleichzeitiger Behandlung mit Cortison setzte sich bei kombinierter Behandlung mit TJT + Cortison fort: hier lag der betreffende Mittelwert auf der gleichen Höhe mit dem nach Gabe von TJT allein (— 10% gegenüber der Norm; 7,10 g-%). Der Mittelwert der Gruppe TJT + Cortison war sowohl in bezug auf den der Kontrollgruppe, als auch auf die der Gruppen 0,05 mg Thyroxin + Cortison und 0,25 mg Thyroxin + Cortison signifikant verschieden.

Der *relative Albumin*-Anteil am Gesamteiweiß zeigte bei der gewählten Versuchsanordnung keine sicheren Abweichungen von der Norm. Er betrug bei den Kontrolltieren 54,1% im Mittel und schwankte

(als Mittelwert) bei den anderen Gruppen nur zwischen 52,5% und 58,0% (Tab. 2).

Die Veränderungen des *absoluten Albumin-Gehaltes* (graphische Darstellung siehe Abb. 2) waren hingegen sehr deutlich und sowohl quantitativ als auch der Richtung nach dem oben beschriebenen Verhalten des Gesamteiweiß-Gehaltes sehr ähnlich.

Schilddrüsenhormone bewirkten eine wie auch beim Gesamteiweiß von Dosi und Art des Hormons abhängige Abnahme des Albumingehaltes.

Tabelle 1. *Veränderungen der Serumeiweiß-Fraktionen normaler Ratten nach Behandlung mit Thyroxin, Trijodthyronin, Cortison, Thyroxin + Cortison und Trijodthyronin + Cortison*

Dosierungsangaben in mg/100 g Ratte/Tag. Versuchsdauer 7 Tage. Zahl der Tiere siehe Tab. 2. Angegeben wird jeweils die Absolutmenge der betreffenden Fraktion in g-%

		Kontrollen	Thyroxin (0,05)	Thyroxin (0,25)	TJT (0,05)	Cortison (2,0)	Thy. (0,05) + Co. (2,0)	Thy. (0,25) + Co. (2,0)	TJT (0,05) + Co. (2,0)
Gesamt-Eiweiß	M	7,99	8,30	7,26	7,35	9,81	9,59	8,56	7,10
	σ_M	0,25	0,11	0,20	0,26	0,22	0,31	0,25	0,23
Albumin	M	4,33	4,67	4,03	3,88	5,35	5,55	4,85	3,80
	σ_M	0,17	0,17	0,20	0,26	0,21	0,21	0,21	0,27
Globulin	M	3,67	3,59	3,37	3,47	4,48	4,04	3,71	3,30
	σ_M	0,14	0,15	0,08	0,14	0,28	0,17	0,16	0,17
α-Globulin	M	0,92	1,06	1,01	1,26	1,28	1,30	1,24	1,03
	σ_M	0,08	0,09	0,07	0,10	0,16	0,13	0,11	0,09
β-Globulin	M	1,78	1,48	1,47	1,39	2,33	1,92	1,67	1,53
	σ_M	0,11	0,08	0,11	0,14	0,17	0,13	0,11	0,12
γ-Globulin	M	0,96	1,00	0,74	0,82	0,86	0,81	0,80	0,73
	σ_M	0,10	0,11	0,07	0,18	0,12	0,08	0,09	0,06

Im einzelnen betrug diese nach 0,05 mg Thyroxin: + 8% (4,67 g-% gegenüber 4,33 der Norm), nach 0,25 mg Thyroxin: — 7% (4,03 g-% gegenüber 4,33 g-%) und nach 0,05 mg TJT: — 10% (3,88 g-% gegenüber 4,33 g-%). Diese Mittelwerte waren zwar von dem der Norm nicht signifikant verschieden; eine gut zu sichernde Differenz bestand jedoch zwischen den Gruppen 0,05 mg Thyroxin und 0,25 mg Thyroxin bzw. 0,05 mg Thyroxin und TJT.

Cortisonbehandlung führte zu einer deutlichen und statistisch hochsignifikanten Albuminzunahme (5,35 g-% gegenüber 4,33 g-%; + 23%). Dieser Wert war auch gegenüber den Mittelwerten nach Schilddrüsenhormongabe signifikant verschieden.

Diese durch Cortison-Zufuhr verursachte Zunahme des Albumingehaltes im Serum blieb auch bei gleichzeitiger Behandlung der Versuchstiere mit 0,05 mg Thyroxin voll erhalten. Der betreffende Mittelwert

betrug 5,55 g-% (+ 28% gegenüber der Norm). Eine Differenz dieses Wertes von dem nach Cortison (5,35 g-%) war nicht nachweisbar, während er von dem der Kontrolltiere hochsignifikant verschieden war.

Nach 0,25 mg Thyroxin + Cortison wurde ein Mittelwert für das Albumin festgestellt, der nur noch um 12% (4,85 g-%) über dem der Norm lag. Dieser Wert war nicht von dem der Norm, wohl aber von dem der Gruppe 0,05 mg Thyroxin + Cortison eindeutig different.

Tabelle 2. *Veränderungen der Serumeiweiß-Fraktionen normaler Ratten nach Behandlung mit Thyroxin, Trijodthyronin, Cortison, Thyroxin + Cortison und Trijodthyronin + Cortison*

Dosierungsangaben in mg/100 g Ratte/Tag. Versuchsdauer 7 Tage. *n* Zahl der Versuchs-Tiere. Angegeben wird jeweils der Prozent-Anteil der betreffenden Fraktion am Gesamt-Serumeiweiß. AGQ Albumin-Globulin-Quotient

		Kontrollen $n = 7$	Thyroxin (0,05) $n = 7$	Thyroxin (0,25) $n = 7$	TJT (0,05) $n = 7$	Cortison (2,0) $n = 6$	Thy. (0,05) + Co. (2,0) $n = 7$	Thy. (0,25) + Co. (2,0) $n = 7$	TJT (0,05) + Co. (2,0) $n = 7$
Albumin	M	54,1	57,3	55,5	52,5	54,7	58,0	56,6	53,3
	σ_M	1,32	1,77	2,07	2,22	2,27	0,96	1,59	2,56
Gesamt-Globulin	M	45,9	42,7	44,5	47,5	45,3	42,0	43,4	46,7
	σ_M	1,33	1,78	2,07	2,22	2,31	0,96	1,59	2,56
AGQ	M	1,19	1,36	1,28	1,14	1,23	1,39	1,23	1,18
	σ_M	0,06	0,09	0,11	0,11	0,12	0,06	0,10	0,12
α-Globulin	M	11,5	12,7	12,5	17,4	13,0	13,5	14,5	14,5
	σ_M	0,70	0,94	0,98	1,68	1,32	1,12	1,41	1,06
β-Globulin	M	22,4	17,9	20,4	19,1	23,8	20,0	19,5	21,8
	σ_M	1,70	1,16	1,77	2,10	1,86	1,33	1,13	1,76
γ-Globulin	M	12,1	12,0	11,7	10,9	8,6	8,5	9,3	10,4
	σ_M	1,21	1,29	1,11	2,18	1,14	0,78	0,94	0,87

Behandlung mit 0,05 mg TJT + Cortison bewirkte ein weiteres Absinken des Albumingehaltes im Serum, entsprechend dem oben geschilderten Verhalten des Gesamteiweiß. Der Mittelwert von 3,80 g-% lag gegenüber der Norm um 12% niedriger. Die Wirkung von TJT blieb somit trotz gleichzeitiger Applikation von Cortison voll erhalten, anders ausgedrückt: der Cortisoneffekt wurde durch gleichzeitige Behandlung mit TJT vollständig aufgehoben. Diese Inhibition der Cortisonwirkung auf das Serumalbumin war auch nach kombinierter Gabe mit 0,25 mg Thyroxin zu beobachten gewesen, im Unterschied zu TJT kam bei dieser Kombination jedoch auch die Schilddrüsenhormon-Wirkung (Albuminabnahme) nicht zur Ausprägung, es resultierte vielmehr ein „pseudonormaler" Albumingehalt des Serums.

Ebenso wie für den relativen Albumingehalt im Serum keine Änderungen im Verlauf der Versuche beobachtet werden konnten, fehlten diese auch für den relativen *Gesamt-Globulin*-Anteil.

Die Änderungen des *absoluten Gesamt-Globulin-Gehaltes* im Serum sind in der Abb. 1 graphisch dargestellt.

Im Gegensatz zu dem Verhalten des Albumins, das nach Verabfolgung von Schilddrüsenhormonen eine Tendenz zu Abnahme zeigte, kam es bezüglich des Globulingehaltes nicht zu sicheren quantitativen Abweichungen von der Norm. Die Mittelwerte lagen zwar unter dem Normalwert, die Differenz war jedoch in keinem Fall zu sichern.

Nach Zufuhr von Cortison trat hingegen ähnlich wie für das Albumin eine deutliche Zunahme des Globulingehaltes ein (von 3,67 g-% auf 4,48 g-%; + 22%). Dieser Globulinanstieg konnte sowohl der Norm als auch den mit Schilddrüsenhormonen behandelten Gruppen gegenüber gut gesichert werden.

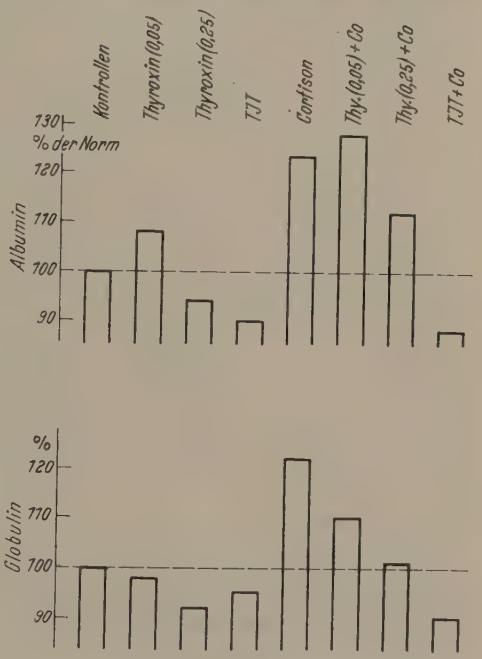


Abb. 2. Das Verhalten von Albumin und Gesamt-Globulin (Absolutwerte) im Serum von Ratten nach Behandlung mit Thyroxin, Trijodthyronin, Cortison, Thyroxin + Corison und Trijodthyronin + Cortison

Die kombinierte Verabfolgung von Schilddrüsenhormonen und Cortison ergab ein Bild, welches in etwa dem entsprach, wie es für das Serumalbumin festgestellt wurde. Nach Gabe von 0,05 mg Thyroxin + Cortison war der Globulinspiegel im Serum gegenüber der Norm noch um etwa 10% höher, die Differenz des Mittelwertes jedoch weder in bezug auf die Cortison- noch auf die Kontrollgruppe signifikant verschieden. Nach 0,25 mg Thyroxin + Cortison sank der Globulinspiegel weiter ab und war mit 3,71 g-% mit dem der Norm (3,67 g-%) identisch. Gegenüber der Cortisongruppe war dieser Wert bereits signifikant verschieden. Nach 0,05 mg TJT + Cortison lag der Mittelwert für das Serumglobulin um 10% unter der Norm d. h. um 26% unter dem Wert nach Cortisongabe allein. Die Differenz zwischen den Mittelwerten der Gruppen Cortison und TJT + Cortison konnte gut gesichert werden, und es

bestand auch Signifikanz für die Differenz der Mittelwerte der Gruppen 0,05 mg Thyroxin + Cortison und TJT + Cortison. Hieraus ergibt sich, daß die durch Cortison verursachte Zunahme des Globulingehaltes im Serum durch gleichzeitige Verabfolgung von Schilddrüsenhormon aufgehoben werden konnte und zwar durch TJT und Thyroxin (in der fünffachen Dosis von TJT).

Entsprechend dem bisher geschilderten Verhalten von Serumalbumin und -globulin wurden keine Veränderungen des *Albumin-Globulin-Quotienten* festgestellt. Da es bei der mit Cortison behandelten Gruppe zu einer gleichmäßigen Zunahme beider Fraktionen kam, fehlte auch hier eine Verschiebung des Albumin-Globulin-Quotienten.

Das für Gesamteiweiß, Albumin und Gesamtglobulin nachgewiesene „antagonistische" Verhalten nach Cortison und Schilddrüsenhormonen konnte hinsichtlich der *α-Globulinfraktion* nicht festgestellt werden.

Hier kam es sowohl nach Schilddrüsenhormonen als auch nach Cortison zu einer *absoluten Zunahme* (relativ blieben auch hier typische Veränderungen aus). Im einzelnen stieg der α-Globulingehalt nach Cortison um 39% (von 0,92 auf 1,28 g-%), nach 0,05 mg Thyroxin um 15% (1,06 g-%), nach 0,25 mg Thyroxin um 10% und nach 0,05 mg TJT um 37% (1,26 g-%). Von diesen Mittelwerten war nur der der TJT-Gruppe von dem der Norm signifikant verschieden; die α-Globulinzunahme nach Cortison konnte wegen der starken Streuung nicht gesichert werden.

Die Veränderungen der α-Globulinfraktionen waren nach Verabfolgung von Schilddrüsen-Hormon und Cortison so uncharakteristisch, daß eindeutige Aussagen nicht möglich waren. Es trat weder eine Addition noch eine gegenseitige Aufhebung des die α-Globuline steigernden Effektes der Hormone ein.

Wie aus der Tab. 1 und aus Abb. 1 hervorgeht, sind die quantitativen Verschiebungen des Gesamtglobulingehaltes nach Behandlung mit Schilddrüsenhormonen und Cortison weitgehend Ausdruck von Veränderungen des *β-Globulinspiegels* im Serum.

Der relative β-Globulingehalt im Serum lag mit 22,4% (im Mittel) bei Ratten deutlich höher als beim Menschen. Unter den hier gewählten Versuchsbedingungen blieb im übrigen der Prozentanteil des β-Globulin am Gesamteiweiß im Serum konstant.

Bezüglich des *absoluten β-Globulin-Gehaltes* ergab sich eine entgegengesetzte Wirkungsrichtung von Schilddrüsenhormonen und Cortison. Nach 0,05 mg Thyroxin sank der Wert um 17% (von 1,78 g-% auf 1,48 g-%), nach 0,25 mg Thyroxin um 18% (1,47 g-%) und nach 0,05 mg TJT um 22% auf 1,39 g-%.

Cortisonverabfolgung hingegen bewirkte eine Zunahme der β-Globuline auf 2,33 g-% (+ 39%) gegenüber der Norm. Mit Ausnahme des Mittelwertes der Gruppe 0,25 mg Thyroxin sind alle andern von dem der Norm signifikant verschieden.

Die eben beschriebenen Abweichungen des β-Globulingehaltes nach oben (Cortison) bzw. nach unten (Schilddrüsenhormone) blieben aus, wenn die Hormone gleichzeitig gegeben wurden: nach 0,05 mg Thyroxin + Cortison betrug der Mittelwert 1,92 g-% (+ 8% gegenüber der Norm), nach 0,25 mg Thyroxin + Cortison: 1,67 g-% (— 6%), nach 0,05 mg TJT + Cortison 1,53 g-% (— 14%). Keiner der genannten Werte war von dem der Norm statistisch signifikant verschieden.

Bei Bezug der Mittelwerte der Kombinationsgruppen auf den Mittelwert der Cortisongruppe ergab sich folgendes: nach 0,05 mg Thyroxin + Cortison lag der Wert um 18%, nach 0,25 mg Thyroxin + Cortison um 28% und nach TJT + Cortison um 34% unter dem der Cortisongruppe. Statistisch waren die Differenzen zwischen den Gruppen 0,25 mg Thyroxin + Cortison und Cortison bzw. TJT + Cortison und Cortison gut gesichert; außerdem bestand Signifikanz für die Differenz der Mittelwerte der Gruppen 0,05 mg Thyroxin + Cortison und 0,05 mg TJT + Cortison. Aus diesem Befund ergibt sich, daß die gleichzeitige Verabfolgung von Schilddrüsenhormonen den die β-Globulinfraktion erhöhenden Effekt von Cortison abschwächte bzw. aufhob. Dabei bestand eine Abhängigkeit dieser Schilddrüsenhormonwirkung von Dosis und Art des verwendeten Hormons (schwache Wirkung von Thyroxin, stärkere von TJT).

Dieser bei der β-Globulinfraktion beobachtete „antagonistische" Effekt von Schilddrüsenhormonen und Cortison fehlte bei der *γ-Globulinfraktion* völlig. Relativverschiebungen in signifikantem Ausmaß blieben hier wie bei allen anderen Fraktionen aus, lediglich nach Cortison und nach 0,05 mg Thyroxin + Cortison trat eine Abnahme des Prozentanteils der γ-Globuline von 12,1 auf 8,6% bzw. 8,5% ein ($p = 0{,}05$ bzw. 0,03).

Bei Berechnung des Absolutgehaltes ergab sich, daß sowohl Cortison- als auch Schilddrüsenhormon-Verabfolgung zu einer mäßigen Abnahme der γ-Globulin-Fraktion führten. Im einzelnen betrugen die Werte nach 0,05 mg Thyroxin: 1,00 g-% (normal 0,96 g-%), nach 0,25 mg Thyroxin: 0,74 g-% (— 23%), nach 0,05 mg TJT: 0,82 g-% (— 15%) und nach Cortison: 0,86 g-% (— 11%). Von diesen Werten war keiner von dem der Norm signifikant verschieden.

Nach kombinierter Verabfolgung von Cortison und Schilddrüsenhormonen kam es zu einer angedeuteten Addition der Hormonwirkungen (besonders nach TJT + Cortison, wonach der Mittelwert um 25% unter dem der Norm lag). Dieser Effekt muß jedoch wegen fehlender Signifikanz als unsicher bezeichnet werden.

Tabelle 3a. *Statistische Auswertung der in Tab. 1 u. 2 zusammengestellten Ergebnisse (Veränderungen von Gesamt-Eiweiß, Albumin-Globulin-Quotient und α-Globulin nach Behandlung mit Thyroxin, TJT, Cortison, Thyroxin + Cortison und TJT + Cortison)*

Gruppennumerierung siehe Methodik

Verglichene Gruppen	Gesamt-Eiweiß p	AGQ p	α-Globulin (abs.) p	α-Globulin (rel.) p
1/2	$> 0{,}1$	$> 0{,}1$	$> 0{,}1$	$> 0{,}1$
1/3	$0{,}05^{+}$	$> 0{,}1$	$> 0{,}1$	$> 0{,}1$
1/4	$> 0{,}1$	$> 0{,}1$	$0{,}016^{+}$	$0{,}002^{++}$
1/5	$< 0{,}001^{+++}$	$> 0{,}1$	$0{,}06$	$> 0{,}1$
1/6	$0{,}002^{++}$	$0{,}035^{+}$	$0{,}025^{+}$	$> 0{,}1$
1/7	$> 0{,}1$	$> 0{,}1$	$0{,}03^{+}$	$0{,}08$
1/8	$0{,}02^{+}$	$> 0{,}1$	$> 0{,}1$	$0{,}045^{+}$
4/2	$0{,}006^{++}$	$> 0{,}1$	$> 0{,}1$	$0{,}035^{+}$
4/3	$> 0{,}1$	$> 0{,}1$	$0{,}06$	$0{,}025^{+}$
2/3	$< 0{,}001^{+++}$	$> 0{,}1$	$> 0{,}1$	$> 0{,}1$
4/8	$> 0{,}1$	$> 0{,}1$	$> 0{,}1$	$> 0{,}1$
5/6	$> 0{,}1$	$> 0{,}1$	$> 0{,}1$	$> 0{,}1$
5/7	$0{,}003^{++}$	$> 0{,}1$	$> 0{,}1$	$> 0{,}1$
5/8	$< 0{,}001^{+++}$	$> 0{,}1$	$> 0{,}1$	$> 0{,}1$
6/7	$0{,}026^{+}$	$> 0{,}1$	$> 0{,}1$	$> 0{,}1$
6/8	$< 0{,}001^{+++}$	$> 0{,}1$	$> 0{,}1$	$> 0{,}1$
7/8	$< 0{,}001^{+++}$	$> 0{,}1$	$> 0{,}1$	$> 0{,}1$

Tabelle 3b. *Statistische Auswertung der in Tab. 1 u. 2 zusammengestellten Ergebnisse (Veränderungen von Albumin und Gesamt-Globulin nach Behandlung mit Thyroxin, TJT, Cortison, Thyroxin + Cortison und TJT + Cortison)*

Gruppennumerierung siehe Methodik

Verglichene Gruppen	Albumin (abs.) p	Albumin (rel.) p	Globulin (abs.) p	Globulin (rel.) p
1/2	$> 0{,}1$	$> 0{,}1$	$> 0{,}1$	$> 0{,}1$
1/3	$> 0{,}1$	$> 0{,}1$	$> 0{,}1$	$> 0{,}1$
1/4	$> 0{,}1$	$> 0{,}1$	$> 0{,}1$	$> 0{,}1$
1/5	$0{,}004^{++}$	$> 0{,}1$	$0{,}025^{+}$	$> 0{,}1$
1/6	$0{,}001^{+++}$	$> 0{,}04^{+}$	$> 0{,}1$	$0{,}04^{+}$
1/7	$0{,}08$	$> 0{,}1$	$> 0{,}1$	$> 0{,}1$
1/8	$> 0{,}1$	$> 0{,}1$	$> 0{,}1$	$> 0{,}1$
4/2	$0{,}014^{+}$	$> 0{,}1$	$> 0{,}1$	$> 0{,}1$
4/3	$> 0{,}1$	$> 0{,}1$	$> 0{,}1$	$> 0{,}1$
2/3	$0{,}035^{+}$	$> 0{,}1$	$> 0{,}1$	$> 0{,}1$
4/8	$> 0{,}1$	$> 0{,}1$	$> 0{,}1$	$> 0{,}1$
5/6	$> 0{,}1$	$> 0{,}1$	$> 0{,}1$	$> 0{,}1$
5/7	$> 0{,}1$	$> 0{,}1$	$0{,}04^{+}$	$> 0{,}1$
5/8	$< 0{,}001^{+++}$	$> 0{,}1$	$0{,}004^{++}$	$> 0{,}1$
6/7	$0{,}04^{+}$	$> 0{,}1$	$> 0{,}1$	$> 0{,}1$
6/8	$< 0{,}001^{+++}$	$> 0{,}1$	$0{,}01^{+}$	$> 0{,}1$
7/8	$0{,}01^{+}$	$> 0{,}1$	$> 0{,}1$	$> 0{,}1$

Tabelle 3c. *Statistische Auswertung der in Tab. 1 u. 2 zusammengestellten Ergebnisse (Veränderungen von β-Globulin und γ-Globulin nach Behandlung mit Thyroxin, TJT, Cortison, Thyroxin + Cortison und TJT + Cortison)*

Gruppennumerierung siehe Methodik

Verglichene Gruppen	β-Globulin (abs.) p	β-Globulin (rel.) p	γ-Globulin (abs.) p	γ-Globulin (rel.) p
1/2	0,05+	0,05+	> 0,1	> 0,1
1/3	0,08	> 0,1	> 0,1	> 0,1
1/4	0,05+	> 0,1	> 0,1	> 0,1
1/5	0,02+	> 0,1	> 0,1	0,05
1/6	> 0,1	> 0,1	> 0,1	0,03+
1/7	> 0,1	> 0,1	> 0,1	> 0,1
1/8	> 0,1	> 0,1	0,05	> 0,1
4/2	> 0,1	> 0,1	> 0,1	> 0,1
4/3	> 0,1	> 0,1	> 0,1	> 0,1
2/3	> 0,1	> 0,1	> 0,1	> 0,1
4/8	> 0,1	> 0,1	> 0,1	> 0,1
5/6	0,09	> 0,1	> 0,1	> 0,1
5/7	0,007++	0,07	> 0,1	> 0,1
5/8	0,0025++	> 0,1	> 0,1	> 0,1
6/7	> 0,1	> 0,1	> 0,1	> 0,1
6/8	0,05+	> 0,1	> 0,1	> 0,1
7/8	> 0,1	> 0,1	> 0,1	> 0,1

Besprechung der Ergebnisse

Das Verhalten der Serumeiweiß-Fraktionen nach gleichzeitiger Behandlung mit Thyroxin und TJT einerseits und mit Cortison andererseits ließ einen „Antagonismus" in der Wirkung beider Hormongruppen erkennen. Nach Cortison kam es zu einem Anstieg sowohl des Gesamteiweiß als auch der Albumine und der β-Globuline. Thyroxin und TJT hingegen bewirkten ein Absinken des Gesamteiweißwertes ebenso wie eine mäßige, absolute Abnahme der Albumin- und β-Globulin-Fraktion. Die Veränderungen der α-Globulinfraktion waren uncharakteristisch.

Der Gesamteiweißwert im Serum war bei kombinierter Behandlung mit Schilddrüsen- und Nebennierenrinden-Hormonen in seiner Höhe von dem quantitativen Verhältnis der beiden Hormongruppen abhängig. Bei relativ geringer Thyroxindosis wurde der Cortisoneffekt praktisch nicht verändert, während bei Verabfolgung von Trijodthyronin die Cortisonwirkung völlig ausblieb. Diese Verschiebungen des Gesamteiweißgehaltes im Serum waren in erster Linie Ausdruck der quantitativen Veränderungen der Albuminfraktion, welche mit denen des Gesamteiweiß parallel gingen.

Auch die absolute Zunahme der β-Globuline nach Cortison bzw. deren Abnahme nach Schilddrüsenhormonen blieb aus, wenn beide Hormongruppen gleichzeitig verabfolgt wurden.

Während somit für Albumine und β-Globulinfraktion ein Antagonismus der betreffenden Hormonwirkungen nachweisbar war, welcher gelegentlich sogar zum Bilde einer „pseudonormalen" Höhe einzelner Fraktionen führte, kam es sowohl nach Cortison als auch nach Schilddrüsenhormonen zu einer geringen Abnahme der γ-Globuline. Kombinierte Verabfolgung beider Hormongruppen rief keine zusätzlichen Veränderungen hervor, ein Antagonismus war nicht nachweisbar. Die beschriebenen Veränderungen der Serumeiweißfraktionen bei Hyperthyreose sind schon geraume Zeit bekannt (Literatur siehe Kleinsorg u. Mitarb. 1955). Auch die Normabweichungen von Gesamteiweiß und β-Globulin unter Abnahme der γ-Globuline im Tierversuch und bei klinischer Anwendung von Cortison wurden bereits beschrieben (vgl. Lewis u. McCullagh 1947; Bossak u. Mitarb. 1955). Die Angaben über Albumin- und Gesamteiweißverminderung bei M. Cushing sind nicht als grundsätzlich abweichende Resultate aufzufassen; es handelt sich dabei meist um Spätstadien eines Hypercortizismus mit Erschöpfung der Eiweiß-Synthese bei gleichzeitig gesteigertem Eiweißabbau.

Über das Zustandekommen des hier beschriebenen „antagonistischen" Effektes von Schilddrüsenhormonen und Cortison lassen sich z. Zt. keine sicheren Aussagen machen. Ein echter Antagonismus im Sinne entgegengesetzter Hormonwirkung auf den Eiweiß-Stoffwechsel ist sehr unwahrscheinlich, da sowohl Cortison als auch Thyroxin wie Trijodthyronin bei hoher Dosierung eine erhebliche Reduktion von Gewebseiweiß verursachen. Andererseits ist die naheliegende Annahme, wonach Änderungen des Plasmavolumens bzw. des Hydrämiegrades für die beobachteten Verschiebungen verantwortlich wären, auf Grund der Unterschiede im Verhalten der Relation der Einzelfraktionen nicht haltbar.

Auch die Ansicht, der entgegengesetzte Hormoneffekt diene der Aufrechterhaltung der Homöostase, ist nicht zutreffend, da im Falle gleichzeitiger „Überfunktion" von Schilddrüse und Nebennierenrinde aus einem beobachteten Antagonismus nicht auf eine Aufhebung der toxischen Wirkung des einen Hormons durch das andere geschlossen werden darf.

Für die Frage der Behandlung von Hyperthyreosen mit Corticoiden folgt hieraus, daß die Indikation zu dieser Therapie nicht aus Einzelbefunden, etwa der Feststellung einer Stoffwechselsenkung durch Cortison (vgl. Krüskemper 1955) oder des hier beschriebenen antagonistischen Effektes von Cortison und Schilddrüsenhormonen auf Serumeiweißfraktionen hergeleitet werden darf.

Zusammenfassung

1. Schilddrüsenhormone verursachen in hoher Dosierung bei Ratten ein Absinken des Eiweißgehaltes im Serum, in erster Linie durch Abnahme der Albumine.

2. Cortison führt über eine Zunahme der Albumin- und β-Globulin-Menge zu einem Anstieg des Gesamteiweißgehaltes im Serum.

3. Bei gleichzeitiger Verabfolgung beider Hormongruppen kommt es zu gegenseitiger Aufhebung der Einzelhormoneffekte in Abhängigkeit von dem quantitativen Verhältnis der verwendeten Hormone.

Literatur

Antweiler, H. J.: Kolloid. Z. **115**, 130 (1949).
Bachmann, R.: Die Nebenniere, in Handbuch der mikr. Anat. d. Menschen, Bd. 6. Berlin-Göttingen-Heidelberg: Springer 1954.
Bossak, E. T., C. J. Wang and D. Adlersberg: Proc. Soc. exp. Biol. (N. Y.) **88**, 634 (1955).
Greenberg, S. M., and K. Aterman: Metabolism **4**, 264 (1955).
Hartmann, F., u. G. Schumacher: Z. Naturforsch. 8b, 361 (1950).
Kleinsorg, H., H. L. Krüskemper u. C. Lopez-Calleja: Naunyn-Schmiedeberg's Arch. exp. Path. Pharmak. **225**, 496 (1955).
Krüskemper, H. L.: Acta endocrinol. (Kopenh.) **19**, 21 (1955a).
Krüskemper, H. L.: Klin. Wschr. **1955**, 182(b).
Lewis, L. A., and E. P. McCullagh: J. clin. Endocr. **7**, 559 (1947).
Longsworth, L. G.: Chem. Rev. **30**, 323 (1942).
Pätau, K.: Biol. Zbl. **63**, 152 (1943).

Dr. Hans-Ludwig Krüskemper, Medizin. Universitäts-Poliklinik, Bonn/Rhein

Arch. exper. Path. u. Pharmakol., Bd. 233, S. 296—300 (1958)

Aus dem Pharmakologischen Institut der Universität Frankfurt a. M.
(Direktor: Prof. Dr. med. P. Holtz)

Über den Noradrenalin- und ATP-Gehalt sympathischer Nerven*

Von
H. J. Schümann
unter Mitarbeit von H. Grobecker

(Eingegangen am 23. Dezember 1957)

In einer vor kurzem erschienenen Arbeit (Schümann 1958) hatte sich in Übereinstimmung mit Befunden anderer Autoren (Falck, Hillarp u. Högberg; Blaschko, Born, D'Iorio u. Eade) zeigen lassen, daß in den hormonhaltigen Granula der chromaffinen Zellen des *Nebennierenmarks* von Hühnern und Ratten ATP in solchen Mengen vorkommt, die für eine salzartige Bindung des Hormons ausreichen würden, wenn man annahm, daß ein Molekül ATP zur Bindung von vier Molekülen Adrenalin befähigt sei. Darüber hinaus hatte sich ergeben, daß bei einer durch *Reserpin* oder *Insulin* verursachten Hormonverarmung der Nebennieren der ATP-Gehalt so abnahm, daß das molare Mengenverhältnis der beiden Stoffe fast unverändert blieb. Auch in *sympathischen Nerven* scheint der hier in Frage kommende Sympathicusstoff *Noradrenalin* wenigstens zum Teil in granulären Elementen gespeichert zu sein (v. Euler u. Hillarp).

In der vorliegenden Arbeit soll untersucht werden, ob die noradrenalinhaltigen Granula sympathischer Nerven auch ATP enthalten, und ob gegebenenfalls das molare Mengenverhältnis zwischen *Noradrenalin* und *ATP* mit demjenigen des *Adrenalins* und des *ATP* der chromaffinen Granula des Nebennierenmarks übereinstimmt.

Methodik

1. Gewinnung der Granula. *Milznerven* (postganglionäre sympathische Nerven) frisch geschlachteter *Rinder* wurden unter Eiskühlung mit der Schere zerkleinert, anschließend mit der 5fachen Menge eiskalter physiologischer Kochsalzlösung in einer Latapiemühle homogenisiert. Das Homogenat wurde zunächst 15 min lang mit 800 × g, die überstehende Lösung erneut 15 min lang mit 12000 × g in einer Spinco-Ultrazentrifuge bei 0—2° C zentrifugiert.

Das aus submikroskopischen corpuskulären Elementen bestehende Sediment wurde mit eiskalter NaCl-Lösung gewaschen und mit einigen Milliliter eisgekühlter 5%iger Trichloressigsäure extrahiert. Der Extrakt wurde zur Entfernung der Trichloressigsäure mehrfach mit Äther ausgeschüttelt, bis das p_H nur noch 4,5—5,0

* Ausgeführt mit Unterstützung der Deutschen Forschungsgemeinschaft.

betrug; der Äther wurde durch Einleiten von Stickstoff vertrieben. Aliquote Teile der wäßerigen Phase dienten zur Noradrenalin- und ATP-Bestimmung.

2. Noradrenalin- und ATP-Bestimmung. Nach den in der vorausgegangenen Arbeit (Schümann 1958) angegebenen Methoden: *Noradrenalin* colorimetrisch und fluorimetrisch, *ATP* mit Hilfe der Feuerfliegenmethode. — Alle Werte sind auf Noradrenalinbase berechnet und auf 1 g Milznerv (Feuchtgewicht) als Ausgangsmaterial bezogen.

3. Verwendete Substanzen. Noradrenalin als Arterenol-Base (Hoechst[1]); ATP der Firma Pabst, Milwaukee/USA (mehr als 95% ATP).

Versuche

1. Noradrenalin- und ATP-Gehalt des Gesamtnerven

10 g Milznerven werden mit 10 ml eisgekühlter NaCl-Lösung homogenisiert; das Homogenat wird mit 30 ml 10%iger Trichloressigsäure versetzt. Der durch Zentrifugieren mit 2000×g erhaltene Niederschlag wird noch einmal mit 20 ml 5%iger Trichloressigsäure extrahiert. In aliquoten Teilen der vereinigten Extrakte wird nach Ausschüttelung mit Äther und Vertreiben des Äthers Noradrenalin (fluorimetrisch) und ATP bestimmt.

Tabelle 1. *Noradrenalin- und ATP-Gehalt von Rindermilznerven*
Mol. Gew. Noradrenalin 169; ATP 507

Vers. Nr.	Noradrenalin γ/g	ATP γ/g	mQ Noradr./ATP
1	5,2	45,0	0,34
2	5,0	32,0	0,46
3	2,8	30,0	0,28
4	5,1	36,0	0,42
Mittelwert	4,5	36,0	0,38

Die Tab. 1 enthält das Ergebnis von 4 Versuchen. Der ATP-Gehalt in γ pro 1 g Nerv ist im Mittel 8mal höher als der Noradrenalingehalt. Der molare Quotient (mQ) Noradrenalin/ATP beträgt im Durchschnitt der Versuche nur 0,38.

2. Verteilung des Noradrenalins im Nerven

Die Tab. 2 enthält die Ergebnisse von 4 Versuchen, in denen in gleicher Weise wie in den Versuchen der Tab. 1 Milznerven (50 g pro Versuch) mit NaCl-Lösung homogenisiert wurden. Um Aufschluß über die Verteilung des Noradrenalins im Nerven zu erhalten, wurde 1. in einem aliquoten Teil des Homogenates, wie in den in der Tab. 1 dargestellten Versuchen, der Noradrenalingehalt bestimmt („Gesamtnerv"); 2. ein Teil des Homogenates mit 800×g (15 min) zentrifugiert, und in der auf diese Weise von gröberen Gewebspartikeln befreiten überstehenden Lösung der Noradrenalingehalt bestimmt („Überstand 800×g"); 3. ein aliquoter Teil vom „Überstand 800×g" mit 12000×g (15 min) zentrifugiert, das Sediment mit eiskalter NaCl-Lösung gewaschen, erneut mit 12000×g (15 min) zentrifugiert, und in dem jetzt

[1] Für die Überlassung danke ich Herrn Prof. Dr. G. Ehrhart, Farbwerke Hoechst.

erhaltenen Sediment der Noradrenalingehalt bestimmt („Sediment 12000 × g"-Granula).

Der Noradrenalingehalt im „Gesamtnerv" wird mit 3 γ/g Nerv im Durchschnitt der 4 Versuche etwas niedriger gefunden als in den Ver-

Tabelle 2. *Verteilung des Noradrenalins im Milznerven*
Für jeden Versuch wurden insgesamt 50 g Milznerven verwendet

Vers. Nr.	1. Homogenat (Gesamtnerv) γ/g	2. Überstand 800 × g γ/g	3. Sediment 12000 × g γ/g	3 in Prozent von 2
1	3,05	2,32	0,57	24,5
2	3,28	1,85	0,53	28,5
3	3,03	1,83	0,53	29,0
4	2,61	1,41	0,45	32,0
Mittelwert	3,00	1,85	0,52	28,5

suchen der Tab. 1 (4,5 γ/g). In der durch Zentrifugieren mit 800 × g von Gewebsresten befreiten überstehenden Lösung beträgt er nur 1,85 γ/g Nerv. Hiervon befinden sich 28,5% in dem durch Zentrifugieren mit 12000 × g erhaltenen, aus granulären Elementen bestehenden Sediment (0,52 γ/g Nerv).

3. Noradrenalin- und ATP-Gehalt der Milznervengranula

In 4 weiteren Versuchen, deren Ergebnisse in Tab. 3 dargestellt sind, wurde in den Milznerven-Granula neben dem Noradrenalin- auch der ATP-Gehalt bestimmt. Es ergab sich ein Noradrenalingehalt von 0,43 γ/g

Tabelle 3. *Noradrenalin- und ATP-Gehalt der Milznervengranula*
Für jeden Einzelversuch wurden 50 g Milznerven verwendet

Vers. Nr.	Noradrenalin γ/g	ATP γ/g	mQ Noradr./ATP
1	0,33	0,17	5,8
2	0,50	0,28	5,3
3	0,36	0,22	4,9
4	0,52	0,33	4,7
Mittelwert	0,43	0,25	5,2

Nerv, ein ATP-Gehalt von 0,25 γ/g im Durchschnitt der Versuche (Tab. 3). Daraus resultiert ein mittlerer molarer Quotient (mQ) Noradrenalin/ATP von 5,2.

Bemerkungen

1. Das Noradrenalin des durch niedrigtouriges Zentrifugieren (800 × g) von gröberen Gewebsbestandteilen befreiten Milznervenhomogenates findet sich in meinen Versuchen zu 28,5% in dem durch hochtouriges Zentrifugieren (12000 × g) gewonnenen, aus granulären

Elementen bestehenden Sediment. In den erwähnten Versuchen v. Eulers u. Hillarps fanden sich nur 15—19% des im Homogenat enthaltenen Noradrenalins in den Granula. Das mag daran liegen, daß von mir alle wesentlichen Aufarbeitungen und Arbeitsgänge bei 0—2° C, von den schwedischen Forschern hingegen bei 12° C vorgenommen wurden.

2. Gegen die Deutung der Versuchsergebnisse im Sinne einer *Speicherung* von Noradrenalin in granulären Elementen der sympathischen Milznerven kann ebenso wie gegen die in früheren Arbeiten gemachte Annahme einer Speicherung von *Adrenalin* in den Granula der chromaffinen Zellen des Nebennierenmarks der Einwand erhoben werden, die Sympathicusstoffe würden nicht in den Granula *gespeichert*, sondern nur durch diese korpuskulären Elemente *adsorbiert* und fänden sich *deshalb* in dem durch hochtouriges Zentrifugieren gewonnenen Sediment. Dieser Einwand ist jedoch m. E. nicht stichhaltig, 1. weil der *Noradrenalin*gehalt der Milznerven-Granula und der *Adrenalin*gehalt der chromaffinen Granula des Nebennierenmarks auch nach mehrfachem Auswaschen mit eisgekühlter NaCl-Lösung nicht nennenswert abnimmt; 2. weil das *Histamin* der Milznerven, die weit mehr Histamin als Noradrenalin enthalten, sich nach hochtourigem Zentrifugieren im granulafreien „Überstand" findet (v. Euler u. Hillarp); 3. weil das von mir in einer früheren Arbeit (Schümann 1956) in Milznerven nachgewiesene *Oxytyramin* sich ebenfalls nicht in den Granula, sondern, wie das Histamin der Nerven, in der nach hochtourigem Zentrifugieren resultierenden überstehenden Lösung findet —, was in einer folgenden Arbeit gezeigt werden soll.

Damit läßt sich ein weiterer, sonst möglicher Einwand entkräften: die in den Versuchen der Tab. 3 ermittelte Relation zwischen Noradrenalin- und ATP-Gehalt der Milznervengranula ($mQ = 5{,}2$) werde durch den Oxytyramingehalt der Milznerven verfälscht; — abgesehen davon, daß die fluorimetrische Bestimmung des Noradrenalins der Nervengranula, wie sie in den Versuchen der vorliegenden Arbeit vorgenommen wurde, durch *Oxytyramin*, selbst wenn es in den Granula neben Noradrenalin vorhanden wäre, nicht nennenswert beeinflußt würde, da Oxytyramin im fluorimetrischen Test 200mal schwächer reagiert als Noradrenalin.

3. Die noradrenalinhaltigen Granula der *Milznerven* — postganglionärer sympathischer Nerven — besitzen die gleichen Sedimentations-Charakteristica wie die Granula der chromaffinen Zellen des Nebennierenmarks. Der molare Quotient Katecholamin: ATP wurde von mir für die chromaffinen Granula des *Nebennierenmarks* von Hühnern und Ratten zu 4—7, für das Mark der Rinder-Nebenniere von Falck,

Hillarp u. Högberg zu 5,0 ermittelt. Für die postganglionären „arterenergischen — noradrenergischen" Milznerven (Holtz) finde ich jetzt einen mQ von 5,2 im Mittel. Das darf wohl als ein weiterer Hinweis darauf gewertet werden, daß ATP sowohl in den granulären Elementen der chromaffinen Zellen des Nebennierenmarks als in den postganglionären sympathischen Nerven für die Speicherung der Sympathicusstoffe von Bedeutung ist.

Summary

1. Splenic nerves of cattle have been found to contain 3—5 γ of noradrenaline and about 40 γ of ATP per 1 g. of fresh tissue. The molar ratio noradrenaline/ATP was 0,38.

2. Homogenates of splenic nerves were centrifuged at 800 $\times$ g. for 15 min. The supernatant contained 1,85 γ of noradrenaline per 1 g. of original tissue.

3. When the supernatant was centrifuged at high speed (12000 $\times$ g.) for 15 min. a sediment of submicroscopical granules was obtained which contained nearly 30% of the noradrenaline.

4. The amounts of 0,43 γ noradrenaline and 0,25 γ of ATP found in these submicroscopical granules (mean of 4 experiments) give a molar ratio noradrenaline/ATP of 5,2. This ratio agrees with the ratio of 5,0 found in chromaffine granules of the adrenal medulla of cattle by Falck et al. and of chicken and rats in my own earlier experiments.

5. The role of ATP in the storage of catechol amines in granular cell constituents is discussed.

Literatur

Blaschko, H., G. V. Born, A. D'Iorio and N. R. Eade: J. Physiol. (Lond.) **132**, 44 P (1956).

Euler, U. S. v., and N.-A. Hillarp: Nature (Lond.) **177**, 44 (1956).

Falck, B., N.-A. Hillarp and B. Högberg: Acta physiol. scand. **36**, 360 (1956).

Holtz, P.: Arterenergische Innervation. Klin. Wschr. **1949**, 338.

Schümann, H. J.: Naunyn-Schmiedeberg's Archiv. exp. Path. Pharmak. **227**, 566 (1956).

Schümann, H. J.: Naunyn-Schmiedeberg's Archiv exp. Path. Pharmak. **233**, 237 (1958).

Prof. Dr. H. J. Schümann,
Pharmakologisches Institut der Universität Frankfurt am Main,
Ludwig-Rehn-Straße 14

Arch. exper. Path. u. Pharmakol., Bd. 233, S. 301—310 (1958)

Aus dem Pharmakologischen Institut der Freien Universität
und dem Organisch-Chemischen Institut der Technischen Universität Berlin

Stoffwechsel und Ausscheidung von m-Inosit*

Von
H. Herken, D. Maibauer und F. Weygand

Mit 2 Textabbildungen

(Eingegangen am 5. Dezember 1957)

Bei der Bestimmung der Inositkonzentrationen in den Zellfraktionen verschiedener Organe wurde mit Hilfe mikrobiologischer Methodik im Cytoplasma der Gehirnzellen eine 10fach größere Menge an freiem Inosit gefunden als in der Leber (D. Maibauer u. H. Herken 1956). Die Sonderstellung des Nervengewebes wurde auch dadurch bestätigt, daß Gewebeschnitte des Gehirnes bei Stoffwechseluntersuchungen in kontinuierlicher Reaktion etwa 2—4 γ m-Inosit/mg Trockengewicht in die physiologische Suspensionsflüssigkeit abgaben. (H. Herken u. D. Maibauer 1954.) Ein gleicher Befund konnte auch bei der Untersuchung sympathischer Ganglien erhoben werden. Die im Blutserum vorhandenen Mengen blieben auffallend hinter den Konzentrationen des Cyclits im Cytoplasma der Gehirnzellen zurück. Die biochemischen Vorgänge, die zu dieser Anreicherung des m-Inosits im Zentralnervensystem führen, sind noch nicht bekannt. Auch ist es nicht gelungen, festzustellen, welche Bedeutung die beträchtlichen Mengen dieses optisch inaktiven Hexaoxy-cyclohexans, das nicht nur in freier Form, sondern auch chemisch gebunden in bestimmten Lipoiden der Zellen vorkommt, für die Hirnfunktion haben.

Bei Anwendung von radioaktivem P^{32} fand R. M. C. Dawson (1954), daß der Umsatz von Phosphor in den durch J. Folch (1949) nachgewiesenen Inosit-Phosphatiden offensichtlich mit wesentlich größerer Geschwindigkeit abläuft als im Kephalin und Lecithin. Auch die Beobachtungen von M. u. L. Hokin (1954), die einen vermehrten Umsatz von P^{32} in den cholinfreien Lipoiden — dazu gehören auch die inosithaltigen Phosphatide — nach Einwirkung von Acetylcholin feststellten, lassen darauf schließen, daß eine Beteiligung bestimmter Inositderivate an Funktionsänderungen der Nervenzellen möglich ist. Dafür spricht auch die interessante Beobachtung von H. Kewitz u. H. Reinert (1954), daß die erregende Wirkung des Acetylcholins am isolierten Cervicalganglion der Katze, die nach Entfernung der Glucose aus der Durchströmungsflüssigkeit wegfällt, durch Zusatz von m-Inosit wieder hergestellt werden kann. Als energielieferndes Substrat kommt dieser Cyclit allerdings nicht in Frage. Dies geht schon daraus hervor, daß der Abfall der Atmung von Hirnschnitten in glucosefreier Ringer-Lösung durch m-Inosit nicht aufgehalten werden kann.

* Mit Unterstützung der Deutschen Forschungsgemeinschaft.

Inzwischen haben wir versucht, die kontinuierliche Abgabe von m-Inosit aus den Gewebeschnitten des Gehirns durch Einwirkung zentralnervöser Pharmaka zu verändern. Dies ist weder durch zentralerregende (z. B. Cardiazol, Pikrotoxin, Cholinesterasegifte) noch durch zentrallähmende (z. B. Veronal, Urethan, Äthyläther, Chlorpromazin und Diethazin) Pharmaka gelungen. Die gleichen Verbindungen führten auch nach der Auslösung von Hirnfunktionsänderungen in vivo zu keiner mikrobiologisch nachweisbaren Störung des m-Inositgehaltes der einzelnen Zellfraktionen. Die Bestimmung der Konzentration des m-Inosits gestattet natürlich noch keine Aussagen über den Umsatz und den Stoffwechsel dieser Substanz im Gehirn, der vielleicht nur sehr langsam abläuft. Das Nervensystem scheint demnach über einen besonderen Mechanismus zu verfügen, der die sehr hohen Konzentrationen des freien m-Inosits im Cytoplasma konstant hält, die offensichtlich als Reservoir für den späteren Einbau in die Inosit-Phosphatide der Mikrosomen, Mitochondrien und Zellkerne dienen. Bei dieser Anreicherung kann es sich kaum um einfache Diffusionsvorgänge handeln, denn die Konzentration des Cyclits/mg Stickstoff ist im Cytoplasma der Gehirnzellen fast 100mal höher als im Blutserum. In diesem Zusmmenhang ist die Beobachtung von D. A. Nixon (1955) interressant, daß der Gehalt des Liquor cerebrospinalis an m-Inosit bei Mensch und Tier nach dem Tode deutlich ansteigt. (Von 3 mg-% auf maximal 72 mg-%.) Dies spricht dafür, daß die Konzentrierung von m-Inosit im Cytoplasma der Gehirnzelle durch einen Stoffwechselprozeß erfolgt, der nach dem Tode aufhört, so daß der Cyclit dann an die Umgebung abgegeben wird.

Nachdem es F. Weygand u. E. Schulze (1956) gelungen war, uniform ^{14}C-markierten m-Inosit darzustellen, ergab sich nunmehr die Möglichkeit, weitere Untersuchungen über den Umsatz dieses Hexaoxy-cyclohexans im intermediären Stoffwechsel des Warmblüters durch Bestimmung der spezifischen Aktivität verschiedener Zellfraktionen durchzuführen. Die vorläufig mitgeteilten Ergebnisse (H. Herken, D. Maibauer u. F. Weygand 1957) wurden inzwischen durch Bilanzversuche zur Prüfung der Ausscheidung des m-Inosits erweitert.

Methodik

Als Versuchstiere dienten männliche Ratten im Gewicht von 230—270 g. Die Applikation sowohl des ^{14}C-markierten als auch des nicht radioaktiven m-Inosits erfolgte durch i.v. Injektion der wäßrigen Lösung in die Schwanzvene. Die Dosis betrug ungefähr 1 mg ^{14}C-markierten m-Inosits/Tier = $\sim$ 4 mg/kg. (Die Menge von 1 mg wurde nicht immer genau eingehalten, da durch mehrmalige Wägungen zuviel Verlust der markierten Substanz in Kauf genommen werden mußte. Die Ergebnisse des Versuches wurden — wenn notwendig — auf die 1 mg-Dosis korrigiert. Die Abweichung der Einwaagen vom 1 mg-Wert betrugen in keinem Falle mehr als 15%.)

Die Dosen des nicht markierten m-Inosits betrugen 1 bzw. 10 mg/Tier = ~ 4 bzw. ~ 40 mg/kg.

Die Darstellung der Zellfraktionen erfolgte in der bereits beschriebenen Weise durch Zentrifugieren des Organhomogenates bei verschiedenen Beschleunigungen. (Einzelheiten der Methodik siehe D. Maibauer u. H. Herken 1956.) Die Bestimmung des nicht markierten m-Inosits erfolgte mikrobiologisch nach der Methode von L. Atkin, W. L. Williams, A. S. Schultz u. C. N. Frey (1950), die Stickstoffbestimmung nach der Methode von Kjeldahl.

Zur Bestimmung der ^{14}C-Aktivität wurde 1 ml der zu untersuchenden Flüssigkeit in einem Quarzröhrchen von 0,8 cm lichter Weite und etwa 7 cm Länge im Ölbad bei einer Temperatur von 70—100° C im Luftstrom getrocknet und in der von F. Weygand (1957) beschriebenen Apparatur verbrannt. Das entstandene CO_2 wurde nach Abtrennung von Wasser und Stickstoff in ein Gaszählrohr gefüllt und die Aktivität gemessen.

Für jede Bestimmung wurde wegen der geringen zur Verfügung stehenden Menge m-Inosit je ein Tier verwendet.

Zur Untersuchung der Ausatmungsluft auf radioaktives CO_2 setzten wir eine Ratte mit dem Einzelkäfig, der für Bilanzversuche besonders konstruiert wurde (H. Herken, G. Senft u. H. Wilutzky 1956) in einen Exsiccator, in den wasser- und CO_2-freie Luft eingeblasen wurde. Nach Passieren des Exsiccators floß der Gasstrom durch 2 hintereinandergeschaltete, mit 4 n-NaOH beschickte Waschflaschen, um das vom Versuchstier ausgeatmete CO_2 zu absorbieren. Das gebildete Carbonat konnte dann mit $BaCl_2$ gefällt, das $BaCO_3$ getrocknet und seine Aktivität wie oben geschildert bestimmt werden.

Die Darstellung des Muskel- und Leberglykogens geschah nach der Methode von Hj. Staudinger (1942) durch alkalische Hydrolyse des Gewebes und nachfolgende Fällung mit Methanol.

Das Phenylosazon wurde nach Hydrolyse des Glykogens in üblicher Weise aus der Glucose gewonnen.

Bei den Bilanzversuchen befanden sich die Tiere (pro Versuch 6—8) in den oben erwähnten Einzelkäfigen, so daß der Urin jedes Tieres gesondert aufgefangen werden konnte. Um eine möglichst gleichmäßige Diurese zu erzielen, erhielten die Tiere vor dem Einbringen in die Käfige je 10 ml Wasser durch die Schlundsonde. Die Bestimmung des m-Inositgehaltes im Urin erfolgte durch Zusatz des durch Aktivkohle filtrierten und entfärbten Harnes zu den Hefekulturen. Bei den Versuchen, bei denen eine hohe m-Inositausscheidung zu beobachten war, mußte der Urin entsprechend der Empfindlichkeit der mikrobiologischen Nachweismethode verdünnt werden.

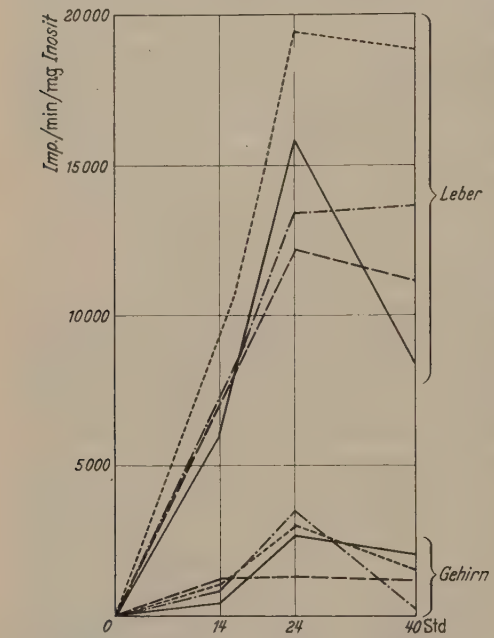
Zur Erzeugung eines Diabetes mellitus erhielten die Tiere nach den Angaben von S. P. Colowick, G. T. Cori u. M. W. Slein (1947) nach einer zweitägigen Hungerperiode 200 mg/kg Alloxan in wäßriger Lösung intraperitoneal. Da bei diesem Vorgehen nicht alle Tiere mit einem Diabetes reagierten, mußte der Urin jeder Ratte auf Zucker hin untersucht werden. Der Nachweis von reduzierenden Substanzen wurde mit der Trommerschen Probe geführt. Nur die Tiere, deren Urin eine stark positive Reaktion aufwies, kamen in den Versuch.

Ergebnisse und Diskussion

Die Aktivität der Zellfraktionen von Leber und Gehirn (ausgedrückt in Imp/min/mg m-Inosit) wurde zu verschiedenen Zeiten nach der intravenösen Injektion von m-Inosit-^{14}C bestimmt. Rechnet man die gefundenen Impulszahlen auf m-Inosit-^{14}C um und gibt sie als Prozent der

Gesamt-Inositmengen der jeweiligen Zellfraktion an, so ergibt sich folgendes Bild:

1. Obwohl das *Gehirn* zu den inositreichsten Organen gehört (W. E. Taylor u. J. M. McKibbin 1953) und gegenüber dem Blutserum eine hohe Inositkonzentration aufrechterhalten muß, ist der Einbau an radioaktiver Substanz in der beobachteten Zeitspanne (maximal 40 Std) sehr gering. Die Werte liegen etwa zwischen 0,1—0,3%; eine genauere Aussage über die Zu- oder Abnahme der Aktivität im Verlaufe der Versuchsperiode läßt sich nicht machen (Abb. 1). Etwa gefundene Unterschiede sind schon durch die Fehlerbreite der benutzten Methoden zu erklären. Daß tatsächlich ein Einbau von m-Inosit-^{14}C in die inosithaltigen Lipoide der Gehirnzellen erfolgt — wenn auch in sehr geringem Umfange — hat U. Friedel (1957) zeigen können. Es ist nicht ausgeschlossen, daß die erheblichen Inositmengen im Gehirn aus anderen Verbindungen synthetisiert werden können. Eine Anreicherung ist aber auch möglich, wenn die Abgabe noch langsamer vor sich geht als der Einbau. Dies würde auch die negativen Ergebnisse der akuten Versuche nach Einwirkung der verschiedenen Pharmaka erklären. Der m-Inosit scheint in den Lipoiden ein „Gerüst" darzustellen, welches selbst an den Umsetzungen im Stoffwechsel nur in geringem Ausmaß teilnimmt, an dem sich jedoch in wesentlich größerem Umfang andere Reaktionen, z. B. Phosphorylierungen und Dephosphorylierungen, abspielen können. (L. E. Hokin u. M. R. Hokin 1956, 1957; R. M. C. Dawson 1954.)



Aktivität ausgedrückt in % Inosit-^{14}C vom Gesamt-Inositgehalt der jeweiligen Fraktion

Leber	KF	0,57	1,00	0,92
	MF	0,50	1,30	0,69
	M_SF	0,58	1,10	1,12
	P	0,88	1,60	1,55
Gehirn	KF	0,10	0,11	0,10
	MF	0,04	0,22	0,17
	M_SF	0,08	0,29	0,02
	P	0,09	0,25	0,13

Abb. 1. Aktivität der Zellfraktionen von Gehirn und Leber nach i.v. Injektion von 1 mg m-Inosit-^{14}C

— — — Kernfraktion
——— Mitochondrienfraktion
— · — · Mikrosomenfraktion
- - - - - - - Plasmafraktion

2. In der *Leber* steigt die Aktivität innerhalb 24 Std in allen Zellfraktionen an. Die jeweilige Aktivität entspricht — als m-Inosit berechnet — zu diesem Zeitpunkt 1,0—1,6% der gesamten Inositmenge. In der Kernfraktion, der Mikrosomenfraktion und im Zellplasma blieb die Strahlung bis zur 40. Std ziemlich konstant. Die Aktivität der Mitochondrienfraktion sank dagegen nach 40 Std wieder deutlich ab (Abb. 1). 24 Std nach der Injektion des m-Inosits-^{14}C verhielten sich die Aktivitäten der einzelnen Zellfraktionen[1] zueinander wie die Gesamtinositmengen[1]. Wenn man sowohl die spezifische Aktivität als auch den Gesamt-Inositgehalt der Kernfraktion gleich 1 setzt und die entsprechenden Werte der anderen Zellfraktionen als Vielfaches davon angibt, so

Tabelle 1. *Vergleich der Aktivitäten der einzelnen Zellfraktionen von Leber und Gehirn nach Applikation von 1 mg m-Inosit-^{14}C i.v. mit dem jeweiligen Gesamt-Inositgehalt* (siehe Text)

Organ	Zellfraktion	γ m-Inosit/mg N	Aktivität entspr. γ m-Inosit-^{14}C/mg N	Aktivität entspr. % m-Inosit-^{14}C der Gesamtinositmenge	Mengen bezogen auf Kernfraktion = 1	
					m-Inosit	Aktivität entsprech. m-Inosit-^{14}C
Leber	Kerne . . .	4	0,04	1,0	1	1
	Mitochondrien	15	0,19	1,3	3,75	4,75
	Mikrosomen .	32	0,36	1,1	8,0	9,0
	Plasma . . .	9	0,14	1,6	2,25	3,5
Gehirn	Kerne . . .	37	0,04	0,1	1	1
	Mitochondrien	18	0,04	0,2	0,5	1
	Mikrosomen .	35	0,1	0,3	1,0	2,5
	Plasma . . .	137	0,33	0,2	3,7	8,25

erhält man für beide Größen ein nahezu gleiches Verteilungsverhältnis (Tab. 1). Es wurde daher zunächst vermutet, daß der applizierte m-Inosit-^{14}C sich gleichmäßig im gesamten „Inosit-Volumen" der Leber verteilt und sich überall in etwa dem gleichen Prozentsatz des Gesamt-Inosits nachweisen läßt[2]. Daß ein Teil des applizierten m-Inosits-^{14}C tatsächlich in die inosithaltigen Lipoide der Leberzellen eingebaut wird, hat ebenfalls U. Friedel nachgewiesen.

Die Beobachtung des Einbaues von *unveränderten* m-Inosit-Molekülen in die (inosithaltigen) Lipoide läßt jedoch nicht den Schluß zu, daß die in den Organen gefundene Radioaktivität allein auf diesem Vorgang beruht. Es stellte sich nämlich heraus, daß die Ausatmungsluft einer Ratte, der m-Inosit-^{14}C (860 γ) verabfolgt worden war, in erheblichen

[1] Auf Milligramm Stickstoff bezogen.

[2] Für das Gehirn sind die Verhältnisse prinzipiell gleich, lediglich die Aktivität der Plasmafraktion ist höher als erwartet. Ob es sich hierbei um eine grundsätzliche Abweichung handelt, ist wegen der geringen Aktivität und der dadurch höheren Fehlerbreite der Messung nicht zu entscheiden.

Mengen radioaktives CO_2 enthielt, eine Beobachtung, die auf eine vollständige Oxydation des Cyclit-Moleküles hinweist. Etwa 20% der zugeführten m-Inositmenge wurde innerhalb 24 Std zu CO_2 oxydiert. Abb. 2 zeigt die Abhängigkeit der $^{14}CO_2$-Ausscheidung von der Zeit.

Über die Funktion des m-Inosits im Warmblüterkörper ist bisher nichts bekannt, obwohl er hier in großen Mengen nachweisbar ist. Für bestimmte Mikroorganismen ist dieser cyclische Alkohol ein Wuchsstoff, der die Bezeichnung Bios I erhielt. (E. V. Eastcott 1928; F. Kögl u. W. van Hassaelt 1936). Es ist jedoch nie gelungen, die Vitaminnatur dieses Stoffes für den Warmblüter durch Erzeugung eines entsprechenden Mangelsyndroms sicher zu beweisen. D. W. Woolley (1940, 1941) hat behauptet, daß m-Inosit-Mangel bei der Maus Alopecie hervorruft. Diese Beobachtung konnte von späteren Untersuchern nicht bestätigt werden (G. J. Martin 1941; G. J. Martin u. S. Ansbacher 1941). Sie wurde sogar widerlegt, als es J. W. Halliday u. L. Anderson (1955) sowie W. H. Daughaday, J. Larner u. C. Hartnett (1955) gelang, die Umwandlung von Glucose in m-Inosit im intermediären Stoffwechsel der Ratte mit Hilfe von ^{14}C-markierter Glucose zu beweisen.

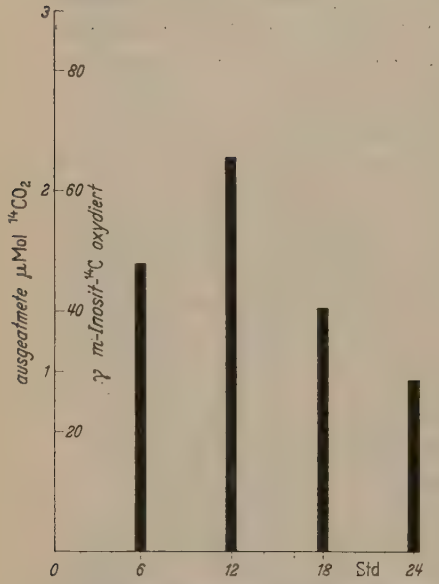


Abb. 2. Ausatmung von $^{14}CO_2$ nach i.v. Gabe von 860 γ m-Inosit-^{14}C. Die Höhe der Säulen gibt die Menge $^{14}CO_2$ an, die jeweils in den 6 Std-Perioden ausgeatmet wurde

Daß der umgekehrte Weg — die Umwandlung des m-Inosits in Glucose — möglich ist, konnte bereits von H. R. Stetten u. D. Stetten jr. (1946) sowie von Th. Posternak, W. H. Schopfer u. D. Reymond (1955) auf Grund von Versuchen mit Deuterium-markiertem m-Inosit gezeigt werden. Da aber wegen der Möglichkeit einer Sprengung der C-H-Bindung vom Deuterium-Umsatz nicht unbedingt auf den Kohlenstoffumsatz geschlossen werden kann, war es notwendig, diese Versuche mit ^{14}C-markiertem Inosit zu wiederholen. Wir konnten nachweisen, daß sich das Kohlenstoff-Isotop nach Applikation von ^{14}C-markiertem m-Inosit im Leber- und Muskelglykogen wiederfinden läßt. Die Aktivität bleibt auch nach mehrmaligem Umfällen sowie nach Überführung der Glucose in das entsprechende Phenylosazon unverändert, so daß eine Verunreinigung mit radioaktivem Material sicher ausgeschlossen ist. Nach 24 Std sind etwa 7% des applizierten m-Inosits-^{14}C auf diese Weise als Glucose nachweisbar, womit die Befunde von Stetten u. Stetten sowie von Posternak u. Mitarb. voll bestätigt werden konnten (Tab. 2). Unter den angegebenen experimentellen Bedingungen ist die Aktivität

im Muskelglykogen mehr als dreimal höher als im Leberglykogen. Die mitgeteilten Befunde stimmen mit Beobachtungen von E. A. Moscatelli u. J. Larner (1957) überein, die mit ähnlicher Methodik gewonnen wurden.

Wie diese Umwandlung zustande kommt, ist noch nicht klar. Eine einfache Spaltung des Ringes wäre denkbar, jedoch ist auch eine Resynthese aus kleineren Bruchstücken möglich. Bei der Untersuchung des umgekehrten Vorganges, nämlich der Bildung von m-Inosit aus Glucose,

Tabelle 2. *Spezifische Aktivität von Leber- und Muskelglykogen 26 Std nach Applikation von m-Inosit-^{14}C (960γ)*

Substanz	Imp/min/mMol Glykogen[1]	Entspr. m-Inosit/mMol Glykogen[1]	Prozent der applizierten Aktivität/Organ
Leberglykogen	5 670[1]	3,67	2
Muskelglykogen	20 412[1]	13,22	5
Leberglykogen[2]	6 156[1]	3,99	2
Muskelglykogen[2]	19 764[1]	12,81	5
Glucosephenylosazon . . . (Leberglykogen)	6 103	4,02	—
Glucosephenylosazon . . . (Muskelglykogen)	20 399	13,22	—

[1] Berechnet auf Glucose. [2] 5mal umgefällt.

hat F. Charalampous (1957) an Hefen zeigen können, daß der m-Inosit aus kleineren Bruchstücken des Glucosemoleküls wieder aufgebaut wird; über entsprechende Reaktionen im Stoffwechsel des Warmblüters ist jedoch bisher nichts bekannt.

Die Bildung von $^{14}CO_2$ sowie der Nachweis markierter Glucose nach der Applikation von m-Inosit-^{14}C läßt eine lange Reihe von Zwischenprodukten vermuten. Aus Glucose entstehen bekanntlich im intermediären Stoffwechsel Verbindungen, die unter anderem durch Fermente in den Mitochondrien (Citronensäurecyclus) umgesetzt werden. Hiermit könnte das Absinken der Aktivität in der Mitochondrienfraktion nach anfänglichem Anstieg in Zusammenhang stehen. Der i.v. zugeführte m-Inosit kann offensichtlich teilweise oxydiert werden, ein anderer Teil — ob als m-Inosit, sei dahingestellt — wird wahrscheinlich „gestapelt". Warum diese Umsetzungsprodukte den Oxydationsvorgängen entzogen werden, ist zur Zeit noch vollkommen unklar. Der Umsatz in den anderen Zellfraktionen geht offensichtlich langsamer vonstatten, so daß sich durch das gleichzeitige Ablaufen der Einbau- und Oxydationsvorgänge zwischen der 24. und 40. Std post injectionem ein „steady state" entwickeln kann.

Bei allen diesen Versuchen wurde gleichzeitig die Aktivität von Stuhl und Urin gemessen. Es stellte sich heraus, daß eine Ausscheidung von aktiven Substanzen ausschließlich über die Nieren erfolgt. Der Stuhl enthielt kein radioaktives Material.

Tabelle 3. *Ausscheidung von Inosit im Urin* (siehe Text)

Normale Tiere

Tierzahl	i.v. inj. Inositmenge mg	mittl. Inositausscheidung in 24 Std (in γ)	Mehrausscheidung in 24 Std nach Insitzufuhr γ	ausgesch. Insitmenge in Prozent der appl. Dosis	Tierzahl	i.v. inj. Inositmenge mg	ausgesch. in γ Inosit	Aktivität in Prozent appl. Dosis
Versuche mit inaktivem Inosit					Versuche mit ^{14}C-markiertem Inosit			
7	∅	113 ± 26	0	0				
7	1	161 ± 78	48	4,8	1	1	37,0	3,7
					1	1	37,0	3,7
					1	1	47,0	4,7
7	10	1 920 ± 381	1 807	18,1				

Alloxandiabetische Tiere

Versuche mit inaktivem Inosit					Versuche mit ^{14}C-markiertem Inosit			
6	∅	551 ± 139	0	0				
8	1	685 ± 396	134	13,4	1	1	115	11,5
6	10	2 214 ± 424	1 663	16,7				

Die teilweise Umwandlung von m-Inosit in Glucose wirft die Frage der Beziehung zwischen m-Inosit- und Kohlenstoffhydratwechsel auf. W. H. Daughaday u. J. Larner (1954) konnten sowohl am diabeteskranken Menschen als auch am alloxandiabetischen Tier zeigen, daß die m-Inosit-Ausscheidung unter diesen Umständen ansteigt. Es ließ sich jedoch nachweisen, daß die Ursache für die vermehrte Inositurie darin zu suchen sein dürfte, daß sowohl Glucose als auch m-Inosit in der Niere bei der Rückresorption konkurrieren. Beim Diabetes wird dieser Vorgang, an dessen Zustandekommen Phosphorylierungen beteiligt sind, durch die vermehrt vorhandene Glucose voll in Anspruch genommen, so daß ein großer Teil des vermutlich glomerulär sezernierten m-Inosits ausgeschieden wird. Der m-Inosit-Gehalt des Blutes ist sowohl beim Diabetiker als auch beim alloxandiabetischen Tier normal. Der Insulinmangel ist wahrscheinlich nur die indirekte Ursache der vermehrten

m-Inosit-Ausscheidung. Auch in unseren mit nicht markiertem m-Inosit durchgeführten Untersuchungen ließ sich beim Alloxan-Diabetes eine 3—4fach gesteigerte m-Inosit-Ausscheidung nachweisen (Tab. 3).

Nach i.v. Belastung mit 1 mg nicht radioaktivem Inosit steigt die Ausscheidung beim normalen Tier innerhalb 24 Std im Durchschnitt um etwa 50 γ an. Das sind ungefähr 5% der applizierten Menge. Wegen der Streuung der Einzelwerte ist der Unterschied statistisch nicht signifikant. Der Befund wird jedoch durch die Bestimmung der Radioaktivität im Urin nach Gabe von 1 mg m-Inosit-^{14}C gesichert: auch hier wird etwa der gleiche Prozentsatz radioaktiven Materials (als m-Inosit angegeben) ausgeschieden. Beim Alloxan-Diabetes besteht ebenfalls eine Übereinstimmung dieser Werte (Tab. 3).

Nach Belastung mit 10 mg nicht radioaktivem Inosit ist der Unterschied der Mehrausscheidung zwischen normalen und alloxandiabetischen Ratten nicht mehr deutlich nachweisbar. Bei Zufuhr hoher Inositdosen überwiegen offensichtlich Diffusionsvorgänge, so daß Unterschiede, die durch die verschiedene Geschwindigkeit der Rückresorption von Glucose und m-Inosit verursacht sind, keine Rolle mehr spielen.

Alle Versuche zeigten, daß der Inositgehalt des Organismus in engen Grenzen konstant gehalten wird. Die Niere ist offenbar imstande, kleinere m-Inositmengen, die den physiologischen Gehalt des Serums nicht wesentlich erhöhen, tubulär zu resorbieren; bei stärkeren Belastungen (bei 10 mg i.v. schon 20%, bei einem in die Tabelle nicht aufgenommenen Versuch nach 100 mg i.v. etwa 80%) werden immer größere Mengen ausgeschieden.

Im Verlauf dieser Untersuchungen wurde auch die Radioaktivität in den Homogenaten anderer Organe ermittelt. Obwohl das Gehirn den höchsten Inositgehalt im Cytoplasma seiner Zellen aufweist, ist der Einbau an Aktivität nach Gabe von ^{14}C-markiertem m-Inosit gering. Im Gegensatz hierzu zeigte die Niere von allen untersuchten Organen (Niere, Pankreas, Hoden, Milz, Skeletmuskel und Leber) die stärkste Radioaktivität. Die besondere Rolle der Niere im Inositstoffwechsel wurde vor kurzem auch durch Versuche von F. Charalampous (1957) hervorgehoben. Ihm gelang es, in diesem Organ ein Fermentsystem nachzuweisen, welches m-Inosit in Glucuronsäure umzuwandeln vermag.

Summary

The activity of the cell-fractions of brain and liver in rats has been estimated after intravenous injections of uniformly ^{14}C-labeled myo-inositol. Twenty-four hours after administration the ratio of the activities of the cell-fractions was the same as the ratio of the total amounts of inositol. Four hours after application of the labeled compound the values were quite the same as those after twenty-four hours, only the mitochondrial fraction being less active than the others.

During the first twenty-four hours about 20% of the administereg dose of labeled myo-inositol was oxidized to $^{14}CO_2$; about 10% beind converted to glucose.

Myo-Inositol is excreted by the kidneys. In agreement with the hypothesis of W. H. Daughaday and J. Larner a tubular reabsorption of myo-inositol is assumed to exist under physiological conditions according to experiments on alloxan-diabetic rats.

The importance of the findings reported is discussed.

Fräulein I. Hoffmeister danken wir für ihre Assistenz bei den Tierversuchen, Herrn Dipl.-Chem. J. F. Klebe und Herrn G. Biessalski für die Phenylosazon-Darstellung und die ^{14}C-Bestimmung.

Literatur

Atkin, L., W. L. Williams, A. S. Schultz and C. N. Frey: zit. nach P. György: Vitamin Methods. New York 1950.
Charalampous, F. C.: J. biol. Chem. **225**, 595 (1957).
Charalampous, F. C., and Ch. Lyras: J. biol. Chem. **228**, 1 (1957).
Colowick, S. P., G. T. Cori and M. W. Slein: J. biol. Chem. **168**, 583 (1947).
Daughaday, W. H., and J. Larner: J. clin. Invest. **33**, 326, 1075 (1954).
Daughaday, W. H., J. Larner and C. Hartnett: J. biol. Chem. **212**, 869 (1955).
Dawson, R. M. C.: Biochim. biophys. Acta **14**, 374 (1954); — Biochem. J. **57**, 237 (1954).
Eastcott, E. V.: J. Physic. Chem. **32**, 1094 (1928).
Folch, J.: J. biol. Chem. **177**, 505 (1949).
Friedel, U.: Diss. Freie Universität Berlin, unveröffentlicht (1958).
Halliday, J. W., and L. Anderson: J. biol. Chem. **212**, 869 (1955).
Herken, H., u. D. Maibauer: Naturwissenschaften **41**, 166 (1954).
Herken, H., G. Senft u. H. Wilutzky: Naunyn-Schmiedeberg's Arch. exp. Path. Pharmak. **229**, 123 (1956).
Herken, H., D. Maibauer u. F. Weygand: Z. Naturforsch. **12 b**, 589 (1957).
Hokin, L. E., and M. R. Hokin: Canad. J. Biochem. **34**, 349 (1956).
Hokin, L. E., and M. R. Hokin: Fed. Proc. **16**, 198 (1957).
Kögl, F., u. W. van Hasselt: Z. physiol. Chem. **242**, 74 (1936).
Maibauer, D., u. H. Herken: Naunyn-Schmiedeberg's Arch. exp. Path. Pharmak. **227**, 456 (1956).
Martin, G. J.: Science **93**, 422 (1941).
Martin, G. J., and S. Ansbacher: Proc. Soc. exp. Biol. (N. Y.) **48**, 118 (1941).
Moscatelli, E. A., and J. Larner: Fed. Proc. **16**, 223 (1957).
Nixon, D. A.: J. Physiol. (Lond.) **129**, 272 (1955).
Posternak, Th., W. H. Schopfer et D. Reymond: Helv. chim. Acta **38**, 1283 (1955).
Staudinger, Hj.: Z. physiol. Chem. **275**, 122 (1942).
Stetten, H. R., and D. Stetten jr.: J. biol. Chem. **164**, 85 (1946).
Taylor, W. E., and J. M. McKibbin: J. biol. Chem. **201**, 609 (1953).
Weygand, F.: Naturwissenschaften **44**, 169 (1957).
Weygand, F., u. E. Schulze: Z. Naturforsch. **11 b**, 370 (1956).
Woolley, D. W.: Science **92**, 384 (1940).
Woolley, D. W.: J. biol. Chem. **139**, 29 (1941).

Prof. Dr. H. Herken, Berlin-Dahlem, Thielallee 69/73, Dr. D. Maibauer Berlin-Dahlem, Thielallee 69/73, Prof. Dr. F. Weygand, Berlin-Charlottenburg, Hardenbergstraße 34

Arch. exper. Path. u. Pharmakol., Bd. 233, S. 311—322 (1958)

Aus den Forschungslaboratorien der CIBA Aktiengesellschaft, Basel,
Pharmazeutische Abteilung

Natrium- und Kaliumgehalt von Plasma und Geweben beim Cortexon-Hochdruck

Von
F. Gross und H. Schmidt

Mit 1 Textabbildung

(Eingegangen am 11. November 1957)

Hohe Dosen von Cortexon führen an der Ratte bei gleichzeitiger Gabe von Kochsalz zu Natrium-, Chlor- und Flüssigkeitsretention, sowie zu Kaliumverlust, als deren Folge nicht nur im Plasma, sondern auch in verschiedenen Geweben Änderungen der Elektrolytzusammensetzung auftreten (Friedman u. Mitarb. 1948, Tobian u. Binion 1954, Daniel u. Daniel 1955, Tobian 1956, Tobian u. Redleaf 1957). Die Zufuhr von Natrium ist eine wesentliche Voraussetzung für das Auftreten der für die Überdosierung von Cortexon und Kochsalz typischen Symptome, insbesondere der Hypertension, der proliferativ entzündlichen Arterienveränderungen und der Anregung der Bindegewebsproliferation (Selye u. Mitarb. 1943, 1949). Dementsprechend treten bei alleiniger Überdosierung von Cortexon ohne gleichzeitige zusätzliche Gabe von Kochsalz weder Hypertension noch andere mit der Natriumretention in Zusammenhang stehende Veränderungen auf (Braun-Menendez u. Prado 1950, Green u. Mitarb. 1955, Tobian 1956, Gross, Loustalot u. Sulser 1956). Andererseits kann unter bestimmten Bedingungen auch nach Unterbrechung der Zufuhr von Cortexon und Kochsalz ein Hochdruck bestehen bleiben (Friedman u. Mitarb. 1951, Green u. Mitarb. 1952). Es ist anzunehmen, daß diesem als „metacorticoid hypertension", post Cortexon-Hochdruck oder Späthochdruck bezeichneten Zustand irreversible Läsionen der die Blutdruckhöhe regulierenden Anteile der arteriellen Strombahn zugrunde liegen. Um weitere Einblicke in die Zusammenhänge zwischen den durch hohe Dosen von Cortexon ausgelösten verschiedenen Stadien des Hochdruckes und den gleichzeitig auftretenden Elektrolytverschiebungen zu erhalten, schien es zweckmäßig, den Natrium- und Kaliumgehalt des Plasmas und einzelner Gewebe während und im Anschluß an Überdosierung von Cortexon und Kochsalz zu untersuchen, um auf diese Weise abzuklären, ob die unter Cortexon auftretenden Veränderungen des Elektrolytgehaltes auch nach Wegfall des auslösenden Agens noch vorhanden sind.

Diese Versuche wurden an drei Gruppen von Tieren vorgenommen, von denen die erste zum Zeitpunkt der vollen Wirkung eines Cortexondepots, die zweite vier Wochen und die dritte neun Wochen später untersucht wurden, wobei die Tiere während der gesamten Versuchsdauer 1%ige Kochsalzlösung als Trinkflüssigkeit erhielten. Auf diese Weise ließ sich der Verlauf der Elektrolytverschiebungen in den untersuchten Geweben parallel zu den Veränderungen des Blutdruckes und der Flüssigkeits- bzw. Kochsalzaufnahme verfolgen. Nach Abschluß dieser Versuche, über die im folgenden berichtet wird, erschien eine Arbeit von Daniel u. Dawkins (1957), die ebenfalls Untersuchungen des Elektrolytgehaltes einzelner Gewebe während des Früh- und Spätstadiums des Cortexon-Hochdruckes zum Gegenstand hat. Auf die darin mitgeteilten Befunde, die in verschiedener Hinsicht von unseren Resultaten abweichen, wird in der Besprechung eingegangen.

Methode

Die Versuche wurden an 38 männlichen Albinoratten mit einem Anfangsgewicht von 100—120 g (Durchschnitt 113 g) vorgenommen. Zu Beginn wurden alle Tiere in Äthernarkose linksseitig nephrektomiert. Cortexon wurde als Kristallsuspension von Cortexonacetat (maximaler Durchmesser der Kristalle 0,1 mm) in einer Dosis von 50 mg/kg dreimal in Abständen von einer Woche subkutan injiziert, die erste Injektion sechs Tage nach der Nierenentfernung. Als Trinkflüssigkeit erhielten die Tiere während der ganzen Versuchsdauer 1% ige Kochsalzlösung, als Futter standardisiertes Trockenfutter (Nafag) mit einem Kochsalzgehalt von 0,6%. Die aufgenommene Flüssigkeitsmenge wurde täglich durch Wägen der Flaschen bestimmt. Körpergewicht und Blutdruck wurden wöchentlich einmal gemessen. Die Blutdruckmessung erfolgte in leichter Äthernarkose mit einer Modifikation der plethysmographischen Methode (Byrom u. Wilson 1938) am Schwanz der Tiere.

Je eine Gruppe von 8—11 Tieren wurde in der 4., 7. u. 12. Woche nach Versuchsbeginn, d. h. eine, vier und neun Wochen nach der letzten Cortexoninjektion getötet und Plasma und Gewebe auf ihren Gehalt an Wasser, Natrium und Kalium untersucht. Bei eröffnetem Thorax wurde aus dem noch schlagenden Herzen durch Punktion Blut mit einer Spritze entnommen, die mit einer 3,8%igen Heparinlösung ausgespült war; Zentrifugieren für 10 min (bei 3000 Touren) und flammenphotometrische Bestimmung[1] von Natrium und Kalium. Anschließend Entbluten aus den eröffneten Carotiden und Entnahme von Aorta, Herzspitze (linker Ventrikel) und m. psoas. Die Aorta wurde unmittelbar oberhalb des Herzens abgetrennt, bis zum Abgang der aa. renales isoliert und dort abgeschnitten. Vom m. psoas wurde nach Entfernung des retroperitonealen Fettgewebes eine sehnenfreie Probe von etwa 0,3 g Gewicht excidiert. Alle Gewebsproben wurden sorgfältig von anhaftendem Blut und Bindegewebe befreit und möglichst rasch in verschlossenen Glasschälchen gewogen (Feuchtgewicht). Die weitere Behandlung der Gewebsproben erfolgte nach der Methode von Lowry u. Hastings (1942), Trocknung während 24 Std bei 100°, Entfettung mit Diäthyläther, Extraktion in 0,75 n HNO_3. Der Wassergehalt wurde aus der Differenz zwischen Feucht- und Trockengewicht errechnet. Natrium und Kalium wurden flammenphotometrisch in dem verdünnten Säureextrakt gemessen. 10 unbehandelte Tiere wurden zur Ermittlung von normalen Ausgangswerten in gleicher Weise untersucht.

[1] Baird Flammenphotometer mit internal lithium standard.

Die Testierung der Nieren auf ihren Gehalt an pressorischen Substanzen erfolgte an der nierenlosen Ratte nach der von Gross u. Sulser (1956) beschriebenen Methode.

Resultate

1. Blutdruck und Flüssigkeitsaufnahme

Unter der Einwirkung hoher Dosen von Cortexon steigt der Blutdruck unter Zunahme der täglichen Trinkmenge und damit vermehrter Salzaufnahme in typischer Weise an. Ausgehend von einem Mittelwert von 105,6 mm Hg zu Beginn des Versuches erreicht der Druck innerhalb von 4 Wochen einen Durchschnitt von 196,4 mm Hg. Gleichzeitig nimmt die Flüssigkeitsaufnahme pro Tag von 31 g auf durchschnittlich 100 g zu (Abb. 1). Nach der letzten Cortexoninjektion bleibt der Druck der überlebenden Tiere für weitere 4 Wochen auf etwa gleicher Höhe, um dann langsam abzufallen. Dabei ist zu berücksichtigen, daß sich die Zusammensetzung des Gesamtkollektivs während des Versuches durch Herausnahme der für die Gewebsanalyse verwendeten Tiere und durch Spontantodesfälle (12 während der gesamten Versuchsdauer) verändert. Die in der 12. Woche noch lebenden 11 Tiere hatten einen durchschnittlichen Druck von 171,8 mm Hg, wobei 7 Tiere einen Hochdruck mit einem Durchschnittswert von 191,4 mm Hg, die restlichen 4 dagegen nur leicht erhöhte Werte mit einem Mittel von 137,5 mm Hg aufwiesen.

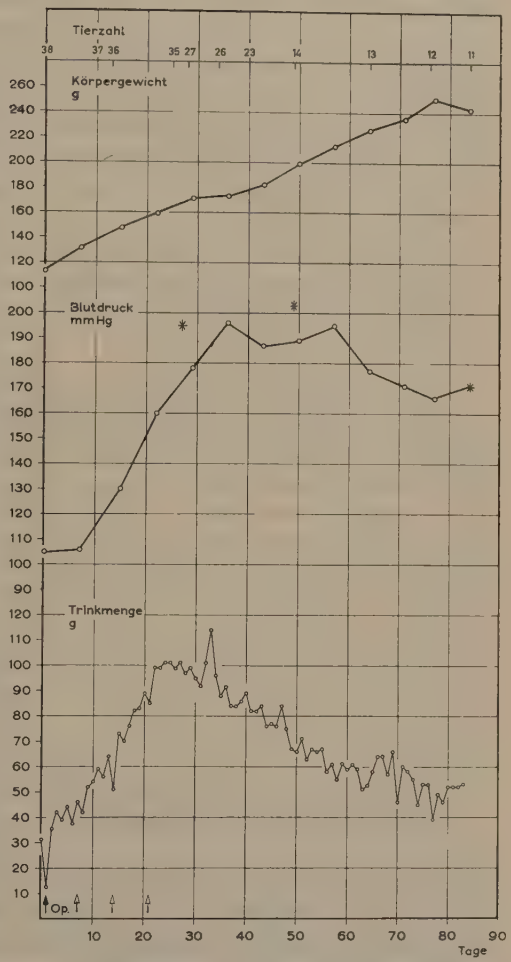


Abb. 1. Körpergewicht (g), Blutdruck (mm Hg) und tägliche Trinkmenge (g) der mit Cortexon behandelten Ratten. Trinkflüssigkeit 1% NaCl-Lösung. ↟ Linksseitige Nephrektomie. † Injektion von je 50 mg/kg Cortexonacetat als Kristallsuspension. * Durchschnittlicher Blutdruck der zu den betreffenden Zeitpunkten (4., 7. und 12. Woche) für die Gewebsanalysen verwendeten Tiere. Abscisse: Zeit in Tagen. Die Zahlen am oberen Bildrand geben die jeweils noch im Versuch befindlichen Tiere an

Die tägliche Trinkmenge nimmt nach der letzten Cortexoninjektion rascher ab als der Blutdruck. Nach acht Wochen, zu einem Zeitpunkt, an dem noch etwa gleich hohe Blutdruckwerte gemessen werden wie nach vier Wochen, ist sie bereits auf 60 g abgefallen und zu Ende des Versuches liegt sie mit durchschnittlich 50 g im Bereich der täglichen Trinkmenge unilateral nephrektomierter Tiere gleichen Gewichtes ohne Vorbehandlung mit Cortexon. Bei Berechnung der durchschnittlichen täglichen Trinkmenge während der gesamten Versuchsdauer von 83 Tagen ergeben sich 68,5 g, was einer Aufnahme von 0,68 g Kochsalz pro Tag entspricht.

Die Trinkmenge ist abhängig von der pro Zeiteinheit aus dem injizierten Depot resorbierten Menge von Cortexon, die nach der letzten Injektion kontinuierlich abnimmt. Im Gegensatz zu Implantationstabletten,

Tabelle 1. *Blutdruck, tägliche Trinkmenge und blutdrucksteigernde Wirkung der Nierenextrakte von Ratten im Stadium des Post-Cortexon-Hochdrucks* (gleiche Tiere wie Gruppe 3, Tab. 2 und in Tab. 3)

Post-Cortexon-Hochdruck (12. Woche)	Tierzahl	Blutdruck (mm Hg)	tägliche Trinkmenge[1] (g)	pressorische Wirkung (mm Hg)	Planimeterwert der Blutdruckkurve (cm²)
Mäßiger Hochdruck . .	4	137,5 (130—145)	47,9 ± 2,8	26,5 ± 6,3	20,25 ± 5,0
Starker Hochdruck . .	7	191,4 (160—215)	71,3 ± 7,9	6,14 ± 1,35	4,7 ± 1,35
p-Werte[2]			$t = 2{,}148$ $p > 0{,}05$	$< 0{,}01$	$< 0{,}01$

[1] Während der letzten drei Versuchswochen.
[2] Signifikanz des Unterschiedes zwischen den beiden Gruppen.

die zu einem beliebigen Zeitpunkt entfernt werden können oder deren vollständige Resorption verhältnismäßig leicht nachweisbar ist, kann nach Injektion von Suspensionen, die Kristalle verschiedener Größe enthalten, nicht genau der Zeitpunkt angegeben werden, an dem die injizierte Menge vollständig resorbiert ist. Auf Grund der Erfahrungen mit Implantationstabletten und verschiedenen Kristallsuspensionen ist anzunehmen, daß vier Wochen nach der letzten Injektion die Cortexonacetat-Kristalle weitgehend resorbiert sind. Noch nicht vollständig resorbierte Reste größerer Kristalle, die noch im subkutanen Gewebe vorhanden sein können, geben pro Tag nur geringe Mengen ab, so daß bei einem nach der 8. Versuchswoche noch bestehenden Hochdruck von einem Spätzustand oder einem post Cortexon-Hochdruck gesprochen werden kann.

Von den nach 12 Wochen überlebenden Tieren tranken die 7 Tiere mit hohem Druck durchschnittlich 71,3 g pro Tag, während die Flüssigkeitsaufnahme der 4 Tiere mit niedrigerem Druck 47,9 g pro Tag betrug (Tab. 1). Es läßt sich somit zwischen Flüssigkeits- und Salzaufnahme und Blutdruckhöhe unter bestimmten Bedingungen ein Zusammenhang nachweisen, wobei allerdings nicht zu entscheiden ist, ob als Folge der Cortexonüberdosierung primär vermehrt Kochsalzlösung aufgenommen wird oder ob sekundäre Schädigungen, besonders der Nieren, verantwortlich für die erhöhten Trinkmengen sind.

2. Natrium und Kalium im Plasma

Der Hämatokrit zeigte während der ganzen Versuchsdauer eine geringe Zunahme. Die Natriumkonzentration im Plasma ist bei allen mit Cortexon behandelten Tieren hoch signifikant gegenüber den Normalwerten erhöht,

Tabelle 2. *Blutdruck, Hämatokrit, Konzentrationen von Natrium und Kalium im Plasma, sowie Wasser-, Natrium und Kaliumgehalt der untersuchten Gewebe bei unbehandelten Tieren und zu verschiedenen Stadien des in Abb. 1 dargestellten Versuches. Injektion von je 50 mg/kg Cortexonacetat wöchentlich innerhalb der ersten 3 Wochen*

	Tierzahl	Blutdruck (mm Hg)	Hämatokrit (%)	Plasma (meq/l)		Aorta			Psoas			Herzmuskel		
				Na	K	H_2O[1]	Na[2]	K[2]	H_2O[1]	Na[2]	K[2]	H_2O[1]	Na[2]	K[2]
Normal	10	113,0 (95—130)	45,2 ±1,03	146,5 ±0,7	5,2 ±0,36	62,9 ±0,5	30,8 ±0,79	13,4 ±0,28	76,8 ±0,18	8,5 ±0,25	52,8 ±0,66	77,8 ±0,27	20,3 ±0,87	35,2 ±0,43
1. Gruppe (4. Woche)	8	195,4 (170—225)	* 48,9 ±1,12	** 152,8 ±1,7	** 3,7 ±0,27	*** 66,9 ±0,32	*** 35,3 ±0,54	*** 15,8 ±0,64	76,9 ±0,15	*** 15,7 ±0,55	*** 42,7 ±0,76	78,2 ±0,14	21,9 ±0,61	* 33,8 ±0,51
2. Woche (7. Woche)	9	203,8 (160—250)	* 49,0 ±1,3	*** 157,4 ±1,8	* 4,5 ±0,22	*** 68,3 ±0,28	30,3 ±0,78	** 15,0 ±0,38	77,0 ±0,08	** 10,3 ±0,5	*** 49,5 ±0,31	77,7 ±0,19	21,3 ±1,09	35,3 ±0,22
3. Gruppe (12. Woche)	11	171,8 (130—215)	* 48,0 ±0,47	*** 154,9 ±1,4	* 4,8 ±0,22	*** 67,4 ±0,79	31,2 ±0,58	* 14,7 ±0,63	76,6 ±0,1	9,04 ±0,36	*** 49,7 ±0,36	77,1 ±0,1	* 22,8 ±2,4	* 33,6 ±0,36

[1] g/100 g Frischgewebe. [2] meq/100 g fettfreies, trockenes Gewebe.
Signifikanz des Unterschiedes gegenüber Normaltieren: * $p < 0{,}05$; ** $p < 0{,}01$; *** $p < 0{,}001$.

Tabelle 3. *Unterteilung der Tiere mit Post-Cortexon-Hochdruck (Tab. 1; Tab. 2, Gruppe 3) entsprechend der Intensität der Blutdrucksteigerung.* Gleiche Bestimmungen wie in Tab. 2

	Tierzahl	Blutdruck (mm Hg)	Hämatokrit (%)	Plasma (meq/l)		Aorta			Psoas			Herzmuskel		
				Na	K	H_2O^1	Na^2	K^2	H_2O^1	Na^2	K^2	H_2O^1	Na^2	K^2
Mäßiger Hochdruck	4	137,5 (130—145)	46,8 ±0,78	152,9 ±0,41	4,35 ±0,27	65,9 ±1,18	31,4 ±0,95	13,7 ±0,69	76,7 ±0,19	9,07 ±0,81	49,3 ±0,65	77,1 ±0,02	23,8 ±0,53	32,8 ±0,72
			>0,3*	<0,001	>0,1	<0,05	>0,6	>0,7	>0,8	>0,4	<0,01	>0,1	<0,02	<0,02
Starker Hochdruck	7	191,4 (160—215)	48,5 ±1,15	156,2 ±0,94	5,03 ±0,29	68,2 ±0,75	31,1 ±0,82	15,2 ±0,83	76,6 ±0,11	9,02 ±0,49	49,9 ±0,63	77,2 ±0,17	22,4 ±1,46	34,0 ±1,04
			>0,05*	<0,001	>0,5	<0,001	>0,8	0,05	>0,6	>0,3	< 0,01	>0,2	>0,2	>0,1

[1] g/100 g Frischgewebe. [2] meq/100 g fettfreies, trockenes Gewebe (siehe Tab. 2). * p-Werte: Vergleich mit Normaltieren.

und zwar auch noch 4 bzw. 9 Wochen nach der letzten Cortexoninjektion (Tab. 2). Trinken einer 1%igen Kochsalzlösung ohne gleichzeitige oder vorherige Gabe von Cortexon führt innerhalb von 12 Wochen ebenfalls zu einer deutlichen Zunahme der Natriumkonzentration im Plasma. Dies geht aus einem anderen Versuch an unilateral nephrektomierten Tieren hervor, die 1%ige Kochsalzlösung als Trinkflüssigkeit erhielten und davon durchschnittlich 52,3 g pro Tag aufnahmen und bei denen sich eine Konzentration von $153{,}2 \pm 0{,}48$ meq/l Natrium im Plasma fand. Die tägliche Trinkmenge überstieg nie 70 g und liegt somit wesentlich niedriger als bei den gleichzeitig mit Cortexon behandelten Tieren.

Im Gegensatz zu der während der gesamten Versuchsdauer erhöhten Natriumkonzentration ist die Konzentration von Kalium im Plasma bei den drei Gruppen nicht in gleicher Weise vermindert. Die niedrigsten Werte finden sich bei der ersten Gruppe, also zum Zeitpunkt der intensivsten Cortexonwirkung, während die Konzentration in der 9. Woche nach der letzten Injektion mit 4,8 meq/l annähernd der Norm entspricht. Die Abnahme des Kaliumgehaltes im Plasma ist somit in stärkerem Maße an die Anwesenheit von Cortexon gebunden als die Zunahme des Natriumgehaltes.

3. Natrium und Kalium im Gewebe

a) Normalwerte. Die untersuchten Gewebe, Aorta, Skelet- und

Herzmuskel, unterscheiden sich in charakteristischer Weise in bezug auf ihren Gehalt an Wasser, Natrium und Kalium (Tab. 2). Die Aortenwand des unbehandelten Tieres enthält nur 62,9[1] Wasser und ist damit flüssigkeitsärmer als der Skelet- und Herzmuskel, die sich mit 76,8[1] und 77,8[1] in ihrem Flüssigkeitsgehalt ungefähr entsprechen. In der Aortenwand findet sich von den drei Geweben am meisten Natrium (30,8[2]) und am wenigsten Kalium (13,4[2]), während der Skeletmuskel umgekehrt am wenigsten Natrium (8,5[2]) und am meisten Kalium (52,8[2]) enthält. Der Gesamtgehalt der beiden Kationen ist in den drei Geweben ebenfalls verschieden und beträgt für die Aorta 44,2[2], für den Skeletmuskel 61,3[2] und für das Herz 55,5[2].

b) Cortexon-Hochdruck (4. Woche). In dieser Gruppe finden sich die deutlichsten Abweichungen von der Norm. In der Aorta ist der Flüssigkeitsgehalt um 6% auf 66,9[1] angestiegen, und ebenso sind die Natrium- und Kaliumkonzentration um 15% bzw. 18% höher als beim Normaltier, so daß auch die Gesamtkonzentration dieser beiden Kationen um beinahe 16% zunimmt (Tab. 2). Im Skeletmuskel ist der Wassergehalt unverändert. Der Natriumgehalt nimmt beinahe um das Doppelte zu, wobei Kalium entsprechend abfällt, so daß die Menge der beiden Kationen nicht ansteigt, sondern sogar eine leichte Abnahme zeigt. Die geringsten Verschiebungen treten im Herzmuskel auf, in dem sich nur eine nicht signifikante Zunahme des Natriumgehaltes und eine entsprechende Abnahme von Kalium nachweisen lassen.

c) Post Cortexon-Hochdruck (7.—12. Woche). In beiden Versuchsgruppen besteht noch eine signifikante Zunahme des Wassergehaltes in der Aorta von 8% bzw. 7% (Tab. 2). Dagegen ist der Natriumgehalt wieder normalisiert, obwohl die Natriumkonzentration im Plasma noch in gleicher Weise erhöht ist wie bei der in der vierten Woche untersuchten Gruppe. Der Kaliumgehalt nimmt ebenfalls ab, ist aber in der zweiten Gruppe noch signifikant gegenüber der Norm erhöht, während die in der dritten Gruppe bestimmten Werte keinen sicheren Unterschied zeigen. Trotz des Anstieges der Kalium-Konzentration im Plasma bei abklingender Cortexonwirkung nimmt somit der Gehalt von Kalium in der Aortenwand ab.

Im Skeletmuskel kehrt der Natriumgehalt zur Norm zurück und entspricht neun Wochen nach der letzten Cortexoninjektion annähernd den Kontrollwerten. Der Kaliumgehalt steigt demgemäß wieder an, ist aber auch bei der dritten Gruppe noch etwas niedriger als bei den Kontrolltieren. Der Gesamtgehalt beider Kationen weicht nicht von der Norm ab. Im Herzmuskel ist in der 12. Woche der Natriumgehalt leicht angestiegen und der Kaliumgehalt entsprechend vermindert.

[1] g/100 g Frischgewebe.
[2] meq/100 g fettfreies, trockenes Gewebe.

Betrachtet man in der dritten Versuchsgruppe die sieben Tiere mit Hochdruck gesondert von den vier Tieren mit nur leicht erhöhtem Blutdruck, so ergeben sich deutliche Unterschiede, vor allem bei der Analyse der Aortenwand (Tab. 3). Der Wassergehalt bei den Tieren mit ausgeprägtem Hochdruck ist höher als bei den Tieren mit nur leicht erhöhtem Druck. Das gleiche gilt für die Kaliumkonzentration, die bei den Tieren mit mäßig erhöhtem Blutdruck nicht von der Norm abweicht, während bei den Tieren mit Hochdruck die Werte annähernd gleich hoch sind wie zum Zeitpunkt der maximalen Cortexonwirkung in der ersten Gruppe.

Die bereits erwähnte Versuchsgruppe, die nur 1% Kochsalzlösung, aber kein Cortexon erhielt, zeigte ebenfalls trotz erhöhter Natriumkonzentration im Plasma keine Zunahme des Natriumgehaltes in der Aorta oder im Skeletmuskel. Der Wassergehalt der Aorta war geringgradig erhöht, lag jedoch wesentlich niedriger als bei den Tieren mit post Cortexon-Hochdruck.

4. Pressorische Substanzen in den Nieren

Die in früheren Arbeiten beschriebene Abnahme der blutdrucksteigernden Wirkung frisch hergestellter Extrakte aus Nieren von Tieren, die mit Cortexon und Kochsalz behandelt wurden, ließ sich bestätigen. Nierenextrakte von Tieren der ersten Versuchsgruppe zeigten keine oder nur eine angedeutete pressorische Wirkung bei Testierung an der nierenlosen Ratte.

Bei der dritten Versuchsgruppe fand sich auch bei dieser Versuchsanordnung ein Unterschied zwischen den Tieren mit Hochdruck und den Tieren mit einer geringgradigen Blutdruckzunahme. Während die Extrakte aus den Nieren der hypertonischen Tiere bei Testierung an der nierenlosen Ratte nur eine durchschnittliche Drucksteigerung von 6,14 mm Hg hervorriefen, stieg der Blutdruck nach Injektion der in gleicher Weise hergestellten Extrakte aus den Nieren der Tiere mit mäßiger Blutdrucksteigerung um 26,5 mm Hg an (Tab. 1).

Besprechung

Überdosierung von Cortexon und Kochsalz führt bei der Ratte innerhalb von vier Wochen nicht nur zu Hypertension, sondern auch zu Anstieg von Natrium und Abfall von Kalium im Plasma, sowie zu einer Zunahme des Natriumgehaltes in der Aorta und besonders im Skeletmuskel, in dem der Gehalt an Natrium nahezu auf das Doppelte des Normalwertes ansteigt. Während jedoch im Muskel gleichzeitig mit der Aufnahme von Natrium eine Abgabe von Kalium erfolgt, nimmt in der Aorta gleichzeitig auch die Kaliumkonzentration zu. Die sich daraus ergebende erhöhte Kationenkonzentration geht mit einer Zunahme des

Wassergehaltes einher. Daniel u. Dawkins (1957) haben in der akuten Phase des Cortexon-Hochdruckes eine Verminderung von Kalium in der Aorta gefunden, im Spätstadium dagegen normale Werte. Der von uns beobachtete Anstieg der Kaliumkonzentration stimmt mit Befunden von Tobian u. Binion (1954) und Tobian (1956) überein, die ebenfalls unter Cortexonüberdosierung statt der erwarteten Abnahme eine Steigerung der Kaliumkonzentration in der Aorta fanden, der sie eine entscheidende Bedeutung für die Pathogenese des Cortexonhochdruckes zumessen. Für diese Auffassung würde auch die von uns festgestellte unterschiedliche Kaliumkonzentration in der Aorta bei Tieren mit post Cortexon-Hochdruck sprechen, von denen diejenigen mit deutlichem Hochdruck noch eine signifikante Erhöhung des Kaliumgehaltes in der Aortenwand zeigen, während er bei den Tieren mit nur wenig erhöhtem Druck normal ist. Im Gegensatz dazu ist trotz Weiterbestehen des Hochdruckes nach Überdosierung mit Cortexon der Natriumgehalt in der Aortenwand beim post Cortexon-Hochdruck nicht mehr erhöht.

Ob tatsächlich, wie dies von Tobian u. Redleaf (1957) angenommen wird, die in der Aorta nachweisbare Zunahme des Kaliumgehaltes einen für den Cortexon-Hochdruck in maßgebender Weise verantwortlichen Faktor darstellt, kann auf Grund der vorhandenen Befunde nur vermutet werden. Ebenso könnte auch der vermehrte Wassergehalt, der als Ausdruck eines Ödems der Aortenwand aufzufassen ist, ursächlich am Zustandekommen oder an der Aufrechterhaltung des Hochdruckes beteiligt sein. Diese Möglichkeit wird auch von Tobian u. Binion (1952) in Betracht gezogen, die bei Patienten mit verschiedenen Formen von Hochdruck im Vergleich zum Gesunden eine Zunahme des Wassergehaltes von 17% in der Wand der Nierenarterien feststellten. Es kann angenommen werden, daß ein Gefäß, dessen Wand ödematös verändert ist, nicht mehr in gleicher Weise wie unter normalen Bedingungen auf regulatorische Maßnahmen reagiert. In beiden Fällen ist jedoch zu bedenken, daß die Aorta und andere große Arterien an der Regulation der Blutdruckhöhe beim Widerstandshochdruck nicht beteiligt sind und daß bisher der Nachweis fehlt, daß entsprechende Veränderungen des Wasser- und Kaliumgehaltes auch in den kleinen Arterien und Arteriolen auftreten. Daniel u. Dawkins (1957) haben eine Neigung zur Zunahme des Wassergehaltes in den von ihnen untersuchten Geweben beim post Cortexon-Hochdruck festgestellt, auch im Skelet- und Herzmuskel, in dem wir keine signifikante Abweichung von der Norm beobachteten.

Die Verschiebungen im Natrium- und Kaliumgehalt des Skeletmuskels bilden sich bei Abnahme der Cortexonzufuhr zurück und haben offenbar keine direkten Beziehungen zum Hochdruck und den ihm zugrunde liegenden Veränderungen. Im Gegensatz zur Aortenwand wird im Muskel Kalium gegen Natrium ausgetauscht, so daß der Gesamtgehalt an beiden Kationen gleich bleibt. Die Möglichkeiten, eine Natriumretention auszugleichen, stimmen somit in den einzelnen Geweben nicht überein. Im Gegensatz zum Skeletmuskel erfährt der Kationengehalt des Herzmuskels kaum Veränderungen. Es zeigt sich auch hier die große Resistenz des Herzmuskels gegenüber Änderungen im „milieu interne".

Im Plasma ist in der post Cortexonphase die Natriumkonzentration erhöht, die Kaliumkonzentration dagegen normal und nicht mehr vermindert wie unter der Einwirkung von Cortexon, so daß die Gesamtkonzentration an Kationen vermehrt ist. Erhöhung der Natriumkonzentration im Plasma durch einfache Zufuhr von 1%iger Kochsalzlösung führt demnach nicht zum Abfall der Kaliumkonzentration, sondern diese tritt erst auf, wenn durch gleichzeitige Gabe eines Corticoids eine Natriumretention im Gewebe erfolgt und Kalium gegen Natrium ausgetauscht wird. Dabei ist nicht zu entscheiden, ob die Natriumretention oder die Kaliumabgabe die primäre Veränderung darstellen.

Als ein wesentliches Ergebnis dieser Untersuchungen ist anzusehen, daß beim post Cortexon-Hochdruck eine beträchtliche Zunahme der Natriumkonzentration im Plasma ohne entsprechende Retention von Natrium in den untersuchten Geweben auftreten kann. Daraus geht einmal hervor, daß sich aus Konzentrationsänderungen der untersuchten Elektrolyte im Plasma keine Rückschlüsse auf analoge Verschiebungen in einzelnen Geweben ziehen lassen und daß eine erhöhte Natriumkonzentration im Plasma keineswegs gleichbedeutend mit einer Natriumretention im Gewebe ist. Aus unseren Untersuchungen geht weiterhin hervor, daß für die Aufrechterhaltung des post Cortexon-Hochdruckes andere Mechanismen als eine Natriumretention maßgebend sein müssen. Es ist durchaus möglich, daß in der akuten und subakuten Phase des Cortexonhochdruckes die Retention von Natrium von entscheidender Bedeutung für die Pathogenese der Hypertension ist. Der auf diese Weise erreichte Hochdruck, der auch nach Wegfall der Cortexonüberdosierung bestehen bleibt, ist aber nicht mehr an die Anwesenheit einer Natriumretention im Gewebe gebunden, sondern es müssen andere Faktoren für die Aufrechterhaltung des Hochdruckes verantwortlich sein.

Nicht abgeklärt ist die Bedeutung der Verminderung pressorischer Substanzen in den Nieren für die Pathogenese des Cortexonhochdruckes. Sie geht parallel mit der Kochsalzaufnahme und ist beim post Cortexon-Hochdruck bei denjenigen Tieren am deutlichsten, die am meisten Kochsalzlösung trinken und bei denen der Blutdruck am deutlichsten erhöht ist. Aus anderen Versuchen geht hervor, daß die Blutdruckhöhe nicht verantwortlich für das Verschwinden der pressorischen Substanzen aus den Nieren ist, sondern daß diese wahrscheinlich von der Natriumkonzentration im Plasma abhängig sind. Für diese Annahme sprechen auch die Resultate früherer Versuche (Gross u. Sulser 1956), in denen Tieren mit post Cortexon-Hochdruck Wasser anstelle von Kochsalzlösung zum Trinken gegeben wurde, und bei denen ein deutlicher Wiederanstieg des Gehaltes an pressorischen Substanzen zu beobachten war, ohne daß gleichzeitig der Blutdruck abfiel.

Summary

1. Sodium and potassium concentration was determined in plasma, aorta, skeletal and heart muscle following overdosage with cortexone-acetate and salt in rats which had consequently developed typical arterial hypertension. Determinations were made one, four and nine weeks after the last of three depot injections of cortexone-acetate.

2. During the early phase at the heigt of the overdosage effect, blood pressure was increased to 195,4 mm Hg and simultaneously plasma sodium increased while plasma potassium fell. In the later or metacorticoid phase of hypertension plasma sodium concentration remained elevated while plasma potassium was about normal nine weeks after the last injection of cortexone.

3. In the aorta there was an increase in water content of 6—8% in the early and late phases. Sodium concentration was only elevated at the time of the maximum cortexone absorption and was found to be normal in metacorticoid animals while potassium concentration was higher than normal in all three groups.

4. In skeletal muscle sodium concentration increased during the early phase whereas potassium content decreased correspondingly, but showed a tendency to become normal by the fourth week after the last cortexone injection and were only slightly different from normal after nine weeks.

5. In the heart muscle there was only a slight and insignificant increase in sodium content and a corresponding diminution of the potassium concentration during the whole experiment.

6. As assayed in the nephrectomised rat, freshly prepared kidney extracts from animals in the early phase of cortexone hypertension show no pressor activity, and this is still definitely diminished nine weeks after interruption of treatment, especially in the kidneys of those animals with pronounced hypertension.

7. In view of the discrepancy between the variation of sodium and potassium concentration in the plasma and in the tissues, investigated at various stages of cortexone overdosage, no conclusion can be drawn from the serum concentrations of these two cations as to their content in various tissues.

8. There is some correlation between the increased water and potassium content of aortic wall and the degree of hypertension, although it is not possible to state that identical changes occur in the small arteries and arterioles responsible for the regulation of the blood pressure.

9. In spite of the increased plasma sodium concentration there was no evidence that metacorticoid hypertension is accompanied by an increase in sodium content in the tissues investigated.

Literatur

Braun-Menendez, E., u. J. L. Prado: Efecto de la concentracion de proteina y de cloruro de sodio en la dieta sobre la accion de la desoxicorticosterona en ratas. Rev. Soc. argent. Biol. **26**, 188 (1950).

Byrom F. B., and C. Wilson: A plethysmographic method for measuring systolic blood pressure in the intact rat. J. Physiol. (Lond.) **93**, 301 (1938).

Daniel, E. E., and B. N. Daniel: Effect of maturity and desoxycorticosterone-induced hypertension on tissue electrolytes. Amer. J. Physiol. **182**, 545 (1955).

Daniel, E. E., and O. Dawkins: Aorta and smooth muscle electrolytes during early and late hypertension. Amer. J. Physiol. **190**, 71 (1957).

Friedman, S. M., J. R. Polley and C. L. Friedman: The effect of desoxycorticosterone acetate on blood pressure, renal function and electrolyte pattern in the intact rat. J. exp. Med. **87**, 329 (1948).

Friedman, S. M., C. L. Friedman and M. Nakashima: Sustained hypertension following the administration of desoxycorticosterone acetate. J. exp. Med. **93**, 361 (1951).

Green, D. M., F. J. Saunders, N. Wahlgren and R. L. Craig: Self sustaining post-DCA hypertensive cardiovascular disease. Amer. J. Physiol. **170**, 94 (1952).

Green, D. M., T. B. Reynolds and R. J. Girerd: Mechanisms of DCA-action. X. Effects on tissue sodium concentration. Amer. J. Physiol. **181**, 1 (1955).

Gross, F., u. F. Sulser: Wirkungsverstärkung von Renin und Nierenextrakt an der nierenlosen Ratte. Naunyn-Schmiedeberg's Arch. exp. Path. Pharmak. **229**, 338 (1956).

Gross, F., u. F. Sulser: Pressorische Substanzen in den Nieren experimentell hypertonischer Ratten. Naunyn-Schmiedeberg's Arch. exp. Path. Pharmak. **229**, 374 (1956).

Gross, F., P. Loustalot u. F. Sulser: Die Bedeutung von Kochsalz für den Cortexon-Hochdruck der Ratte und den Gehalt der Nieren an pressorischen Substanzen. Naunyn-Schmiedeberg's Arch. exp. Path. Pharmak. **229**, 381 (1956).

Lowry, O. H., and A. B. Hastings: Histochemical changes associated with aging. J. biol. Chem. **143**, 257 (1942).

Selye, H., C. E. Hall and E. M. Rowley: Malignant hypertension produced by treatment with desoxycorticosterone acetate and sodium chloride. Canad. med. Ass. J. **49**, 88 (1943).

Selye, H., H. Stone, P. S. Timiras and C. Schaffenburg: Influence of sodium chloride upon the actions of desoxycorticosterone acetate. Amer. Heart J. **37**, 1009 (1949).

Tobian, L., and J. T. Binion: Tissue cations and water in arterial hypertension. Circulation **5**, 754 (1952).

Tobian, L., and J. T. Binion: Artery wall electrolytes in renal and DCA hypertension. J. clin. Invest. **33**, 1407 (1954).

Tobian, L.: The effect of desoxycorticosterone with either high or low sodium diets on electrolyte composition of arterial wall. J. clin. Invest. **35**, 740 (1956).

Tobian, L., and P. D. Redleaf: Effect of hypertension on arterial wall electrolytes during desoxycorticosterone administration. Amer. J. Physiol. **189**, 451 (1957).

Dr. F. Gross, Forschungslabor. der Ciba AG., Pharmaz. Abteilung, Basel/Schweiz

Arch. exper. Path. u. Pharmakol., Bd. 233, S. 323—337 (1958)

Aus den Forschungslaboratorien der Ciba Aktiengesellschaft, Basel,
Pharmazeutische Abteilung

Verstärkung der pressorischen Wirkung von Renin, drucksteigernden Peptiden und adrenergischen Wirkstoffen nach Nephrektomie und bei Überdosierung von Cortexon* und Kochsalz an der Ratte

Von
F. Gross und P. Lichtlen

Mit 6 Textabbildungen

(Eingegangen am 14. November 1957)

Entfernung beider Nieren führt an der Ratte zu einer Verstärkung und Verlängerung des Blutdruckanstieges nach Injektion von Renin (Masson 1954), sowie zu einer Steigerung der Empfindlichkeit gegenüber pressorisch wirkenden Peptiden, wie Hypertensin (Angiotonin) und Vasopressin (Pitressin), während die durch Adrenalin oder Nor-Adrenalin hervorgerufene Drucksteigerung nur in geringem Maße verstärkt ist (Gross u. Sulser 1956). Andererseits ist bei akuter Überdosierung von Cortexon sowohl die Reaktion auf Renin als auch die Empfindlichkeit gegenüber Adrenalin und Nor-Adrenalin gesteigert (Silva u. Croxatto 1950/1952). Die stärkere pressorische Wirkung adrenergischer Substanzen nach Vorbehandlung mit Cortexon mit oder ohne zusätzliche Gabe von Kochsalz ist von Raab (1950) auch am Menschen beobachtet und als ein für die Pathogenese bestimmter Hochdruckformen wesentlicher Faktor angesehen worden. Im Gegensatz dazu fanden Masson u. Mitarb. (1950) unter Überdosierung mit Cortexon und Kochsalz weder an der Ratte noch am Hund eine verstärkte Reaktion nach intravenöser Gabe von Adrenalin, Renin oder Angiotonin und schlossen daraus, daß diese Form des Hochdruckes nicht mit einer gesteigerten Empfindlichkeit des arteriellen Systems auf pressorische Reize einhergeht. Die gleichen Autoren berichten jedoch in einer späteren Arbeit (1955), daß sowohl an der nierenlosen als auch an der mit Cortexon und Kochsalz vorbehandelten, nicht narkotisierten Ratte Renin stärker drucksteigernd wirkt als am Normaltier.

Die in diesen Arbeiten beschriebenen Versuche beschränken sich im wesentlichen auf die Bestimmung des Blutdruckanstieges nach Injektion

* Entsprechend der internationalen Nomenklatur wird Desoxycorticosteron als Cortexon bezeichnet [Helv. Chim. Acta **34**, 680 (1951)].

einzelner Dosen der genannten pressorischen Stoffe, während abgesehen von einer Arbeit über Renin (Goldblatt u. Mitarb. 1953) bisher keine systematischen Untersuchungen über die Abhängigkeit der Intensität und Dauer der Drucksteigerung von der Höhe der Dosis vorliegen. Dies gilt besonders für Tiere mit experimenteller Hypertension infolge Überdosierung mit Cortexon und Kochsalz. Die vorliegende Arbeit wurde mit dem Ziel ausgeführt, diese Lücke zu schließen und um genauere quantitative Angaben über das Ausmaß der Empfindlichkeitssteigerung nach Nierenentfernung oder bei Überdosierung mit Cortexon und Kochsalz machen zu können. Dabei stand die Abklärung der folgenden Fragen im Vordergrund:

1. Bestimmung der Beziehungen zwischen Dosis, Intensität und Dauer des drucksteigernden Effektes für Renin, Hypertensin, Vasopressin und adrenergische Wirkstoffe.

2. Vergleich der beiden zu einer Verstärkung der pressorischen Wirkung führenden Maßnahmen (doppelseitige Nephrektomie und Vorbehandlung mit Cortexon und Kochsalz) im Hinblick auf Stärke und Dauer der hypertensiven Reaktion.

3. Analyse der für die gesteigerte Empfindlichkeit verantwortlichen Faktoren und ihre mögliche Bedeutung für die Pathogenese der Hypertension.

Methoden

Alle Versuche wurden an männlichen Wistar-Ratten im Gewicht von 200 bis 300 g vorgenommen. Die akute drucksteigernde Wirkung der verschiedenen Substanzen wurde mit Hilfe eines an die art. carotis communis angeschlossenen Quecksilbermanometers in Urethannarkose (1,4 g/kg s.c.) bestimmt. Die Injektionen wurden in die linke vena jugularis gegeben, wobei die verabreichte Flüssigkeitsmenge jeweils 0,1 ml betrug. In allen Versuchen wurde vorgängig der Prüfung der zu untersuchenden Substanz die Reaktion des Blutdruckes auf eine Testdosis (2 γ/kg) von Adrenalin und Nor-Adrenalin bestimmt.

a) Geprüfte Substanzen.

1. Adrenalin und Nor-Adrenalin in Dosen von 0,5—10 γ/kg.

2. Renin, extrahiert aus Schweinenieren in Dosen von 1—1000 γ/kg. Es handelt sich um ein Rohpräparat, von dem 250 γ/kg an der mit Dial narkotisierten Katze eine durchschnittliche Blutdrucksteigerung von 35 mm Hg hervorrufen[1].

3. Hypertensin (Angiotonin), das in Form eines gereinigten Präparates enthaltend 1200—1500 Hunde-E/mg Substanz zur Verfügung stand und von dem 0,1—50 E/kg gegeben wurden[2].

4. Synthetisches $Ileu_5$ Hypertensin II (Schwyzer et al. 1957), ein Oktapeptid, das dem Rinderhypertensin II entspricht und das an der Ratte eine 2—4fach stärkere blutdrucksteigernde Wirkung besitzt als Nor-Adrenalin. Dosen: 0,5 bis 10 γ/kg.

---

[1] Wir danken Herrn Dr. A. Kleinberg, Princeton, N. J. für die Herstellung des Präparates.

[2] Wir danken Herrn Dr. H. Schwarz, Cleveland Clinic, Research Division, Cleveland, Ohio, für die Überlassung des Präparates.

5. Vasopressin in Form von Pitressin (Parke, Davies & Co.) in Dosen von 0,0025—0,5 E/kg.

6. Ocytocin in Form eines Extraktpräparates aus Hypophysenhinterlappen (Pituitrin, Parke, Davies & Co.) in Dosen von 0,01—1,0 Voegtlin Einheiten/kg.

7. Synthetisches Ocytocin (Syntocinon, Sandoz) in Dosen von 0,001—1,0 E/kg.

b) Auswertung. Jede Dosis wurde an 6—12 Tieren gegeben. Ausgewertet wurden die maximale Drucksteigerung in mm Hg und die Dauer bis zur Rückkehr auf den Ausgangswert in Minuten. Zusätzlich wurde das Integral der Blutdruckkurve als Maß für das Produkt Wirkung × Zeit planimetrisch bestimmt. Aus den pro dosi ermittelten Einzelwerten wurde der Mittelwert und dessen mittlerer Fehler (standard error) nach der Formel

$$\varepsilon = \pm \sqrt{\frac{\Sigma d^2}{n(n-1)}}$$

bestimmt. Für die Beziehungen zwischen Dosis und Wirkung wurden die Regressionsgeraden nach der Formel $y = \bar{y} + b(x - \bar{x})$ bestimmt, wobei $\bar{x}$ den Mittelwert der Dosis, $\bar{y}$ den Mittelwert des Druckanstieges oder der Wirkungsdauer bezeichnen.

c) Vorbehandlung der Tiere. Die pressorische Wirkung der genannten Substanzen wurde

1. am intakten Tier,
2. am nierenlosen Tier,
3. bei Überdosierung mit Cortexon und Kochsalz geprüft.

Die Nierenentfernung erfolgte in Äthernarkose, 20—24 Std vor der Testierung der drucksteigernden Wirkung, nachdem in früheren Versuchen festgestellt worden war, daß eine maximale Verstärkung der pressorischen Aktivität von Renin und Nierenextrakten erst einige Stunden nach Nierenexstirpation nachweisbar ist (Gross u. Sulser 1956).

Die mit Cortexon behandelten Tiere wurden zunächst unilateral links nephrektomiert und erhielten anschließend in Abständen von 1 Woche insgesamt 4mal je 50 mg/kg Cortexonacetat als Kristallsuspension (mittlerer Kristalldurchmesser bis 0,1 mm) subcutan injiziert. Die Nahrung bestand aus Trockenfutter Lab. Blox R der Allied Mills mit einem Kochsalzgehalt von 0,5%; Trinkflüssigkeit 1% Kochsalzlösung. Der Blutdruck wurde einmal wöchentlich plethysmographisch in Äthernarkose am Schwanz nach der von Byrom u. Wilson (1938) angegebenen Methode bestimmt. Nach 4—5 Wochen, zum Zeitpunkt der Testierung der verschiedenen Substanzen, war der Blutdruck bei den 53 in dieser Weise vorbereiteten Tieren auf einen Mittelwert von 195,9 ± 3,4 mm Hg angestiegen.

Resultate

Der in Urethannarkose zu Beginn der akuten Versuche bestimmte Ausgangsblutdruck war bei blutiger Messung in der art. carotis communis bei intakten und nephrektomierten Tieren mit 76,8 ± 3,9 mm Hg bzw. 76,3 ± 7,7 mm Hg etwa gleich. Bei den mit Cortexon und Kochsalz vorbehandelten Tieren lag er bei 99,2 ± 5,3 mm Hg. Dieser Wert ist um annähernd 100 mm Hg niedriger als der durchschnittliche Blutdruck, der kurz vorher in leichter Äthernarkose mit der plethysmographischen Methode gemessen wurde. Dieser Befund bestätigt die von uns beschriebene Drucksenkung in Urethan- oder langdauernder, tiefer Äthernarkose bei Ratten mit Cortexonhochdruck (Gross 1957).

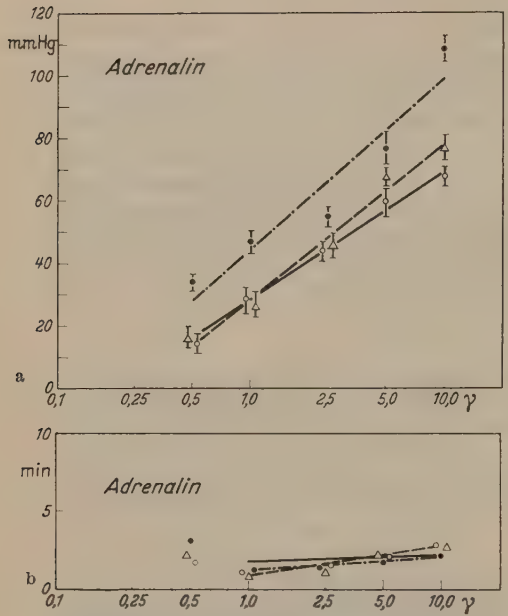


Abb. 1a u. b. Adrenalin. Regressionsgerade für die Abhängigkeit von Intensität (a) und Dauer (b) der Drucksteigerung von der Dosis. Ordinate: Blutdruck in mm Hg (a) und Zeit in Minuten (b). Abszisse: Dosis in γ/kg (logarithmischer Maßstab). —— intaktes Tier; ——— nierenloses Tier; ·—·—· mit Cortexon und Kochsalz behandeltes Tier. Durchnittswerte aus je 8—12 Versuchen

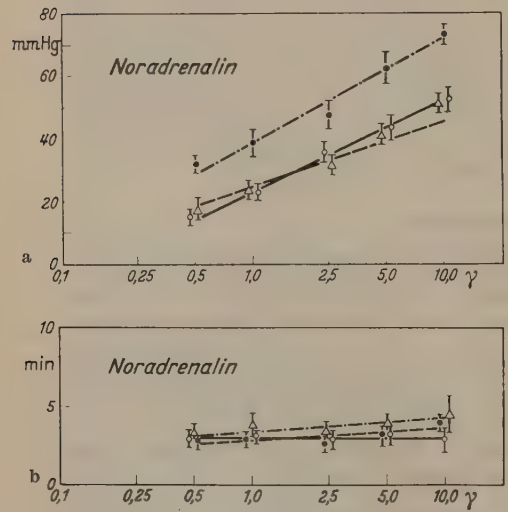


Abb. 2a u. b
Nor-Adrenalin. Bezeichnungen wie in Abb. 1a u. b

a) Adrenergische Wirkstoffe. Im untersuchten Dosisbereich findet sich an der nierenlosen Ratte im Vergleich zum intakten Tier weder für Adrenalin noch für Nor-Adrenalin eine signifikante Verstärkung der pressorischen Wirkung (Abb. 1 u. 2). Die in früheren Versuchen (Gross u. Sulser 1956) mit der Einzeldosis von 2 γ/kg beobachtete geringe Verstärkung der pressorischen Wirkung war somit unter den jetzigen Bedingungen nicht nachweisbar. Im Gegensatz dazu ist die Empfindlichkeit des mit Cortexon und Kochsalz vorbehandelten Tieres im gesamten Dosisbereich gesteigert, so daß die Dosis-Wirkungskurve nach links verschoben ist, im wesentlichen aber parallel zu der für das intakte Tier bestimmten verläuft. Die Wirkungsschwelle ist zwar erniedrigt, der Wirkungszuwachs aber bei Steigerung der Dosis etwa gleich.

Die Dauer des Druckanstieges nimmt in allen 3 Versuchsanordnungen mit steigender Dosis nur unwesentlich zu und ist auch bei den mit Cortexon und Kochsalz vorbehandelten Tieren trotz größerer Intensität der Drucksteigerung nicht verlängert. Es besteht daher im untersuchten Dosenbereich keine Korrelation zwischen Höhe und Dauer des Druckanstieges.

b) Renin. Sowohl nach Nierenentfernung als auch bei Überdosierung von Cortexon und Kochsalz ist die pressorische Wirkung erheblich verstärkt. Die Kurven sind nicht nur nach links verschoben, sondern steigen auch steiler an als die in diesem Dosenbereich annähernd parallel zur Abszisse verlaufende Kurve des intakten Tieres (Abb. 3), bei dem die

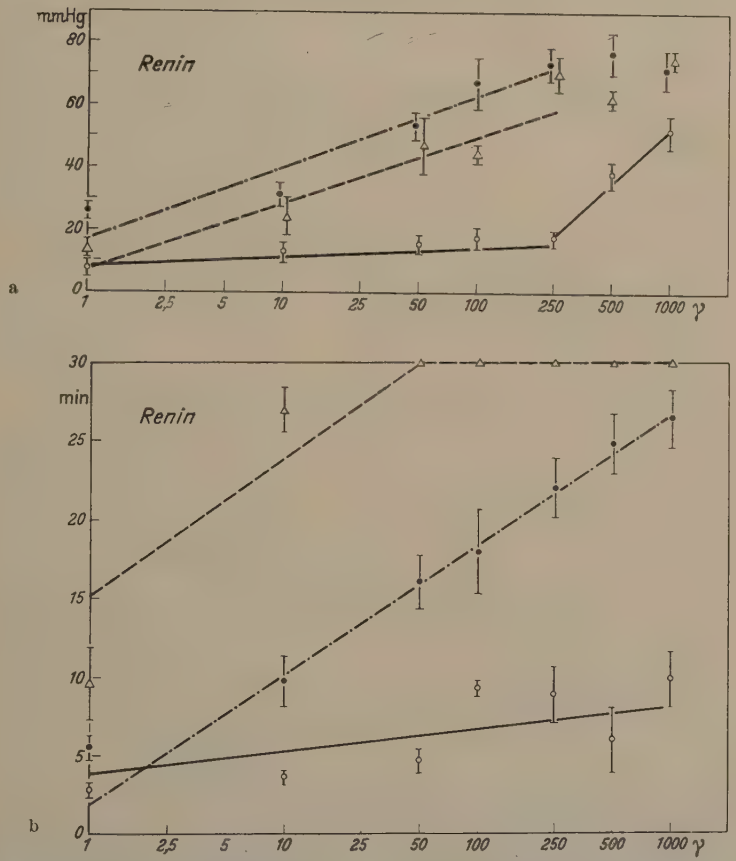


Abb. 3a u. b. Renin. Bezeichnungen wie in Abb. 1a u. b. Da die Versuche nur bis zur 30. min ausgewertet wurden, die Drucksteigerung beim nierenlosen Tier aber länger anhält, entsprechen die bei dieser Versuchsanordnung mit Dosen über 50 γ/kg angeführten Werte nicht der tatsächlichen Dauer der Drucksteigerung

Zunahme des Druckes auf maximale Werte auf einen kleinen Dosenbereich beschränkt ist (250—1000 γ). Die mit Cortexon behandelten Tiere sind dabei etwas empfindlicher als die nierenlosen. In beiden Versuchsanordnungen wird ein Maximaleffekt mit niedrigeren Dosen als beim intakten Tier erreicht, der auch durch weitere Erhöhung der Dosis nicht mehr zu verstärken ist, so daß die Dosis-Wirkungskurve in diesem

Bereich (250—1000 γ) annähernd parallel zur Abszisse verläuft. Die absoluten Maxima der Drucksteigerung sind dabei mit 70 mm Hg in beiden Versuchsanordnungen etwa gleich.

Die Dauer des Druckanstieges ist beim nierenlosen Tier am stärksten verlängert, bei dem nach Dosen von 50 γ und mehr der erhöhte Druck innerhalb der Versuchsdauer von maximal 30 min nur unbedeutend

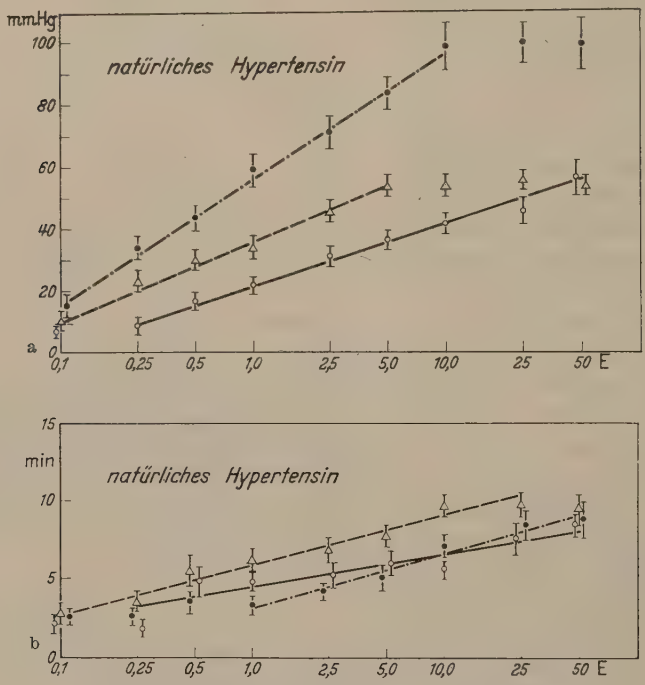


Abb. 4a u. b. Natürliches Hypertensin (Angiotonin)

absinkt. Auch bei Vorbehandlung mit Cortexon klingt die Drucksteigerung nur langsam ab, jedoch ist die Verzögerung weniger ausgesprochen als bei Fehlen der Nieren. In beiden Versuchsanordnungen besteht in einem bestimmten Dosenbereich eine positive Korrelation zwischen Intensität und Dauer der Drucksteigerung.

c) Hypertensin (Angiotonin). In ähnlicher Weise wie bei Renin ist die pressorische Wirkung von Hypertensin an dem mit Cortexon vorbehandelten Tier mehr verstärkt als nach Entfernung der Nieren, und zwar findet sich dieses Verhalten sowohl bei Anwendung von natürlichem als auch von synthetischem Hypertensin (Abb. 4 und 5). Im Gegensatz zu Renin führt aber Hypertensin bei den Tieren, die Cortexon erhielten, zu einem höheren maximalen Druckanstieg als beim nierenlosen Tier. Die

Dosis-Wirkungskurve verläuft dementsprechend steiler und nimmt über den unter Renin erreichten Maximalwert von 70 mm Hg hinaus weiterhin linear zu bis auf 100 mm Hg. Beim nierenlosen Tier ist dagegen der maximale Druckzuwachs nach Injektion von Hypertensin und von Renin etwa gleich und erreicht nur etwas mehr als die Hälfte der Drucksteigerung beim Cortexon-Tier. Diese größere absolute Druckzunahme nach Injektion von Hypertensin bei Tieren, die in gleicher Weise mit Cortexon vorbehandelt wurden, zeigt, daß die Begrenzung des Druckanstieges bei Erhöhung der Renin-Dosis nicht auf der Unmöglichkeit zu weiterer Drucksteigerung beruht, sondern auf der Eigenart der sie auslösenden Substanz.

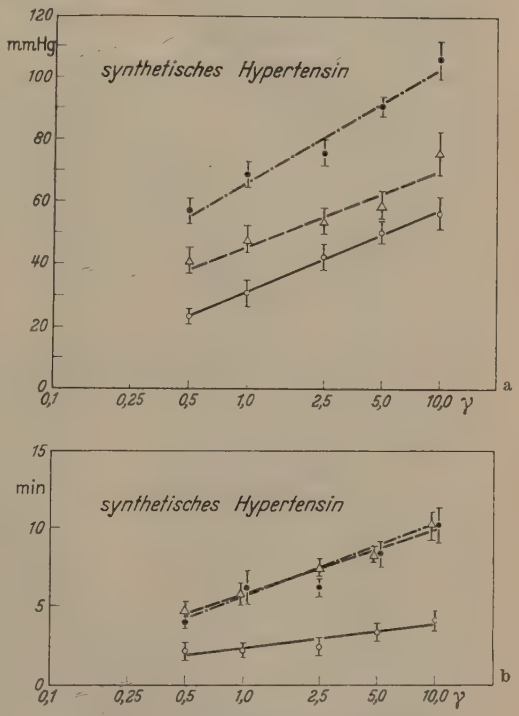


Abb. 5a u. b. Synthetisches Hypertensin (Ileu$_5$ Oktapeptid)

Im Gegensatz zur Intensität ist die Dauer des Druckanstieges bei den mit Cortexon behandelten Tieren nicht stärker verlängert als bei den nierenlosen Tieren. Für synthetisches Hypertensin verlaufen beide Kurven übereinstimmend und zeigen im gesamten Bereich eine Verlängerung gegenüber dem intakten Tier, während sich für natürliches Hypertensin kein sicherer Unterschied zwischen den Kontrolltieren und den mit Cortexon vorbehandelten erkennen läßt und nur das nierenlose Tier eine signifikante Verlängerung der Dauer aufweist. Die beim intakten Tier gegenüber synthetischem Hypertensin beobachtete geringe Abhängigkeit der Dauer von der Höhe des Druckanstieges entspricht dem für adrenergische Wirkstoffe gefundenen Verhalten.

d) Vasopressin, Ocytocin. Von den Wirkstoffen des Hypophysenhinterlappens verhält sich Vasopressin sehr ähnlich wie Hypertensin. Die Intensität der Drucksteigerung ist bei Vorbehandlung mit Cortexon mehr verstärkt als beim nierenlosen Tier, wobei in beiden Gruppen etwa gleiche Maximalwerte erreicht werden wie bei Injektion von Hypertensin (Abb. 6).

Die Dosis-Wirkungskurve verläuft beim intakten Tier etwas steiler als diejenige von Hypertensin, wobei sich jedoch im Bereich niedriger Dosen ebenso wie für Renin ein fast paralleler Verlauf zur Abszisse findet, da auch hier Erhöhung der Einzelgabe zunächst nur zu einer Verlängerung der Wirkung führt und noch nicht zu einer Zunahme der Drucksteigerung.

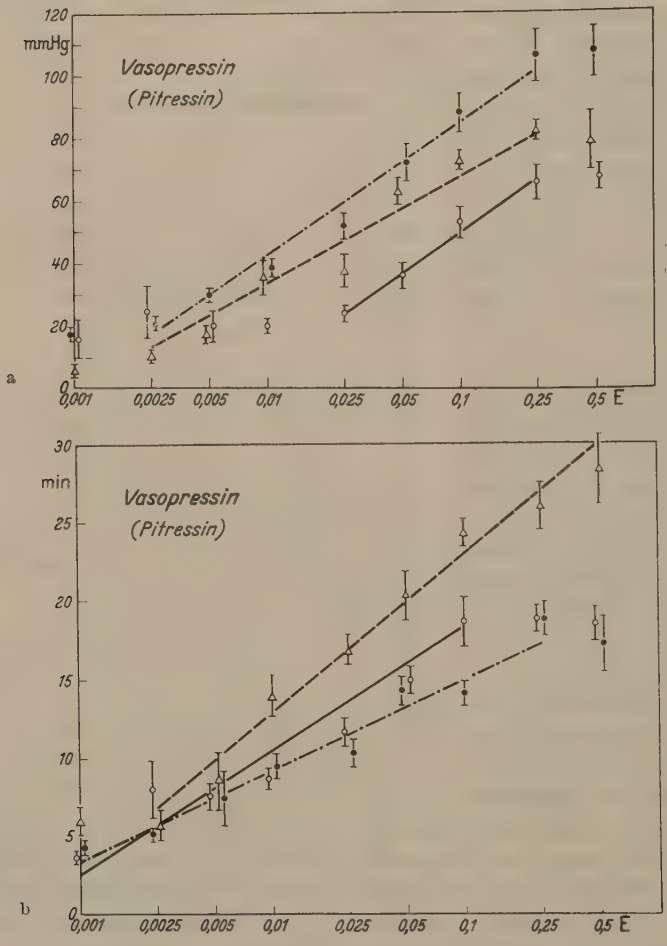


Abb. 6a u. b. Vasopressin (Pitressin)

Die Wirkungsdauer ist in stärkerem Maße als bei Hypertensin in Abhängigkeit von der Dosis verlängert. Ebenso wie bei natürlichem Hypertensin tritt dies nach Nierenentfernung am deutlichsten in Erscheinung, während sich das mit Cortexon behandelte Tier trotz höherem Druckanstieg nicht vom intakten Tier unterscheidet. Die maximale

Verlängerung der Wirkungsdauer beträgt in diesen beiden Gruppen etwa 20 min, während sie beim nierenlosen Tier, das weniger hohe Maximalwerte erreicht, bis zu 30 min anhält.

Orientierende Versuche mit synthetischem Vasopressin ergaben ein gleiches Verhalten, so daß hier ähnliche Beziehungen vorliegen wie bei extraktiv gewonnenem und synthetischem Hypertensin.

Aus Hypophysenhinterlappen extrahiertes Ocytocin (Pituitrin) verhält sich sehr ähnlich wie Vasopressin, was im wesentlichen auf den in

Tabelle 1. *Relative Dosen, die beim nephrektomierten und mit Cortexon-Kochsalz behandelten Tier zur Erzielung eines bestimmten Druckanstieges notwendig sind* Dosen ausgedrückt in Prozent der am Normaltier für eine gleiche Drucksteigerung (100%) erforderlichen Dosis

		Blutdrucksteigerung um		
		40 mm	50 mm	60 mm
Adrenalin	ne	90	85	77,5
	cx	42	38	32,8
Nor-Adrenalin	ne	—	—	—
	cx	27	23,2	—
synthetisches Hypertensin	ne	26,8	30	38
	cx	4,1	7,4	—
natürliches Hypertensin	ne	14	13,5	—
	cx	4,8	2,5	1,64
Renin	ne	5,5	10,6	—
	cx	1,6	2,9	—
Vasopressin Pitressin	ne	25,2	30	35,2
	cx	14,8	14,5	15,8
Ocytocin (Pituitrin)	ne	26	31	38,2
	cx	7	6,2	4,3

ne = bilateral nephrektomierte Ratten.
cx = mit Cortexon-Kochsalz behandelte Ratten.

dem verwendeten Präparat vorhandenen Gehalt an Vasopressin zurückzuführen sein dürfte. Der stärkste Druckanstieg findet sich bei den mit Cortexon behandelten Tieren, die größte Verlängerung der Wirkungsdauer beim nierenlosen Tier. Synthetisches Ocytocin ruft dagegen weder am intakten Tier noch nach Nierenexstirpation oder nach Vorbehandlung mit Cortexon und Kochsalz eine dosenabhängige pressorische Wirkung hervor.

Um ein Maß für die Steigerung der Empfindlichkeit unter den verschiedenen Versuchsbedingungen zu erhalten, wurden die Dosen der untersuchten hypertensiv wirkenden Substanzen berechnet, die notwendig sind, um am nierenlosen Tier und nach Vorbehandlung mit Cortexon einen gleichen Anstieg des Blutdruckes hervorzurufen wie am intakten Tier. Tab. 1 gibt eine Zusammenstellung der für eine

Druckzunahme um 40, 50 und 60 mm Hg notwendigen Dosen, ausgedrückt in Prozent der beim unbehandelten Tier für einen gleichen Anstieg notwendigen Menge, die gleich 100 gesetzt ist. Daraus geht z. B. die erhebliche Verstärkung der pressorischen Wirkung von Hypertensin bei Vorbehandlung mit Cortexon deutlich hervor, da unter diesen Bedingungen bereits mit $^1/_{60}$ der beim intakten Tier erforderlichen Dosis der Druck um 60 mm Hg zunimmt. Für Renin findet sich eine ähnliche Wirkungsverstärkung in diesem Bereich.

Besprechung der Ergebnisse

Mit Cortexon und Kochsalz vorbehandelte Ratten weisen gegenüber allen geprüften Substanzen eine erhöhte Empfindlichkeit im gesamten Dosenbereich auf, während beim nierenlosen Tier nur die drucksteigernde Wirkung von Renin und den untersuchten Peptiden verstärkt ist, nicht aber diejenige der adrenergischen Substanzen. Bei der Beurteilung dieser Befunde ist zunächst zu berücksichtigen, daß sich die beiden zu einer Verstärkung der pressorischen Wirkung führenden Maßnahmen in bezug auf die Einwirkungsdauer grundsätzlich voneinander unterscheiden. Während die Vorbehandlung mit Cortexon und Kochsalz 4 Wochen beansprucht, innerhalb deren nicht nur ein Hochdruck, sondern noch zusätzliche Veränderungen auftreten, handelt es sich bei der Nierenentfernung um einen akuten Eingriff mit ganz anderen Folgen. Chronische Überdosierung von Cortexon und Salz löst regulatorische Vorgänge aus, durch die der Organismus versucht, eine Überladung mit Kochsalz zu verhindern oder auszugleichen, während bei Entfernung der Nieren sowohl wegen der Schwere des Eingriffes als auch wegen der kurzen nachfolgenden Zeitspanne keine Möglichkeit für kompensatorische Maßnahmen besteht. Trotzdem führen offenbar beide Versuchsanordnungen an dem für die Ansprechbarkeit auf bestimmte pressorische Stoffe verantwortlichen Anteil des arteriellen Systems zu Veränderungen, die die Wirkung drucksteigernder Stoffe in ähnlicher Weise beeinflussen.

Eine den beiden Versuchsanordnungen gemeinsame Abweichung stellt das Fehlen eines unter normalen Umständen in der Niere vorhandenen Vorrats an pressorischen Stoffen dar. Durch Nierenexstirpation werden diese Substanzen sofort entfernt und bei dem mit Cortexon überdosierten Tier läßt sich in frisch hergestellten Nierenextrakten keine pressorische Aktivität mehr nachweisen, ein Befund, der auf das Fehlen von Renin oder ähnlichen Stoffen zurückgeführt werden muß (Gross u. Sulser 1956). Dabei ist nicht anzugeben, ob die Produktion dieser Stoffe unterdrückt ist oder ob es sich um eine Entleerung von Vorräten infolge eines vermehrten Bedarfes handelt. Somit gehen sowohl die Entfernung der Produktionsstätte von pressorischen Substanzen (Renin) als auch deren weitgehende Verminderung in den Nieren mit einer gesteigerten

Empfindlichkeit gegenüber exogen zugeführtem Renin und drucksteigernd wirkenden Peptiden wie Hypertensin und Vasopressin einher, während die Empfindlichkeit gegenüber adrenergischen Wirkstoffen durch diesen Vorgang weniger beeinflußt wird, da Nierenentfernung nur von geringem Einfluß ist. Die Intensivierung der drucksteigernden Wirkung von Renin ist dabei am nierenlosen Tier stärker als für die untersuchten Peptide, so daß offenbar die Anwesenheit der Nieren für die Reaktion des intakten Tieres auf Renin von wesentlicher Bedeutung ist. Die Annahme ist naheliegend, daß in der Niere spezifische Proteasen und wahrscheinlich auch Peptidasen vorhanden sind, die sowohl Renin als auch hypertensiv wirkende Polypeptide wie Hypertensin und Vasopressin zu inaktivieren vermögen. Für Vasopressin ist die Inaktivierung durch die Niere von Heller u. Mitarb. (1956) nachgewiesen worden. Allerdings haben kürzlich Dicker u. Nunn (1957) angegeben, daß die drucksteigernde Wirkung von Vasopressin nach Nierenentfernung gegenüber der Norm abgeschwächt ist. Möglicherweise ist diese Abweichung von unseren Befunden darauf zurückzuführen, daß die Testierung von Vasopressin bereits 1 Std nach Entfernung der Nieren erfolgte, während in unseren Versuchen Vasopressin erst 20 Std nach Nierenexstirpation injiziert wurde.

Bisher ist nicht anzugeben, wie sich das aus der Niere isolierte Renin zu dem in der Niere gebildeten und im Organismus zur Wirkung gelangenden „natürlichen" Renin verhält und ob beide Stoffe identisch sind. Die Tatsache, daß in den Nieren der mit Cortexon und Kochsalz vorbehandelten Tiere keine pressorischen Substanzen mehr vorhanden sind, spricht dafür, daß enge Beziehungen zwischen diesen Stoffen und den Mechanismen bestehen, die zugeführtes Renin zu inaktivieren vermögen. Die Wirkungsverstärkung von exogen zugeführtem Renin nach Entfernung der Nieren und bei Vorbehandlung mit Cortexon und Kochsalz legt die Vermutung nahe, daß die mit der von uns verwendeten Methode in der Niere nachweisbaren pressorischen Substanzen an der Inaktivierung von zugeführtem Renin beteiligt sind.

Überdosierung mit Cortexon und Kochsalz hat eine deutlichere Zunahme der Empfindlichkeit gegenüber Renin und besonders den untersuchten Peptiden zur Folge als Entfernung der Nieren und ruft zusätzlich eine Verstärkung der drucksteigernden Reaktion auf adrenergische Wirkstoffe hervor. Der Wegfall der auf Grund ihrer pressorischen Eigenschaften charakterisierten Substanzen in der Niere kann daher nicht allein als Ursache für die intensivere Druckzunahme in Betracht gezogen werden, sondern es ist anzunehmen, daß bei Tieren mit Cortexonhochdruck der für die Regulation des Blutdruckes verantwortliche Anteil des arteriellen Systems stärker auf drucksteigernde Substanzen reagiert als unter normalen Bedingungen. Dafür spricht auch der Befund,

daß Renin und Hypertensin am nierenlosen Tier zu einem etwa gleichen Druckmaximum führen, das auch bei Steigerung der Dosis nicht überschritten wird, während bei den mit Cortexon überdosierten Tieren die pressorische Wirkung von Hypertensin und Vasopressin wesentlich mehr verstärkt ist als diejenige von Renin. Der verschiedene Ablauf der Reaktion nach Gaben von Renin und von Hypertensin bei Cortexon-Überdosierung ist ein Hinweis dafür, daß Renin seine drucksteigernde Wirkung nicht nur über eine Freisetzung von Hypertensin entfaltet, da in diesem Fall die Druckzunahme für beide Substanzen zumindest in einem bestimmten Dosisbereich gleich sein sollte. Die drucksteigernde Wirkung von Hypertensin ist jedoch über den gesamten Dosenbereich mehr verstärkt als diejenige von Renin.

Die Annahme einer erhöhten Empfindlichkeit der Arteriolen auf adäquate humorale Reize stimmt mit der Auffassung von Raab (1950) überein, steht dagegen im Widerspruch zu den von Masson u. Mitarb. (1950) erhobenen Befunden. Bei der Suche nach einer Erklärung für die verstärkte Reaktion des mit Cortexon vorbehandelten Tieres auf hypertensiv wirkende Stoffe sind die Befunde von Tobian u. Binion (1954) sowie von Tobian u. Redleaf (1957) anzuführen, aus denen hervorgeht, daß Überdosierung mit Cortexon und Kochsalz in der Aorta eine Zunahme des Wassergehaltes und einen Anstieg der Natrium- und Kaliumkonzentration hervorruft. In eigenen Versuchen konnten wir diese Beobachtungen weitgehend bestätigen, wobei auch dann noch ein vermehrter Wassergehalt nachweisbar war, wenn die Konzentrationen der beiden Kationen nicht von der Norm abwichen, der Blutdruck aber erhöht war (Gross und Schmidt 1958). Am nierenlosen Tier finden sich keine entsprechenden Veränderungen der Kationenzusammensetzung der Aortenwand, deren Flüssigkeitsgehalt aber leicht ansteigt (Ledingham 1954). Obwohl nicht anzugeben ist, ob die in der Aorta festgestellten Änderungen der Kationenkonzentration und des Wassergehaltes sich in gleicher Weise auf das gesamte arterielle System erstrecken, ist auf Grund der histologischen Befunde bei Cortexon-Überdosierung zu vermuten, daß der Flüssigkeitsgehalt in der Wand der kleinen Arterien und Arteriolen ebenfalls zunimmt. Von Folkow (1956) ist darauf hingewiesen worden, daß strukturelle Abweichungen der Arterien zumindest teilweise für die gesteigerte Empfindlichkeit auf pressorische Substanzen bei Hypertension verantwortlich zu machen sind, wobei die vermehrte Einlagerung von Flüssigkeit als Vorstufe schwererer morphologischer Veränderungen anzusehen ist. Welche Rolle dem Natrium dabei zukommt, ist auf Grund der bisherigen Befunde nicht anzugeben.

Der erhöhte Ausgangsblutdruck als solcher, der sich bei Cortexonüberdosierung am nicht narkotisierten Tier findet, dürfte für die gesteigerte Empfindlichkeit auf drucksteigernde Substanzen ohne direkte Bedeutung sein, da bei deren Prüfung in Narkose der Druck nur unwesentlich erhöht ist. Obwohl bei den mit Cortexon vorbehandelten Tieren in Urethannarkose der Ausgangsblutdruck um etwa 20 mm Hg höher liegt als bei den beiden anderen Gruppen, werden dabei die stärksten absoluten Drucksteigerungen bis zu Maximaldrucken über 200 mm Hg erreicht. Der etwas höhere Ausgangsdruck beeinträchtigt daher die Fähigkeit zur zusätzlichen Drucksteigerung nicht.

Für die gesteigerte Empfindlichkeit gegenüber pressorisch wirkenden Stoffen unter den gegebenen Versuchsbedingungen sind somit zwei verschiedene Mechanismen in Betracht zu ziehen:

1. Die verminderte, verzögerte oder fehlende Inaktivierung oder Eliminierung von Renin und Peptiden, die entweder auf Entfernung der Nieren zurückzuführen ist oder mit der Abnahme der auf Grund ihrer pressorischen Eigenschaften nachgewiesenen Nierenwirkstoffe zusammenhängt.

2. Eine verstärkte Reaktionsfähigkeit des arteriellen Systems auf hypertensive Stoffe, die allerdings nicht gegenüber allen Substanzen in gleicher Weise in Erscheinung tritt.

Beim akuten Vorgang der Nierenentfernung gelangt nur der erste Faktor zur Wirkung, während sich bei der chronischen Anwendung von Cortexon und Kochsalz zusätzlich eine veränderte Reaktionslage entwickelt. Beide Mechanismen können sich unter geeigneten Bedingungen partiell addieren, wie z. B. bei der Empfindlichkeitszunahme, die das mit Cortexon vorbehandelte Tier auf Hypertensin zeigt, oder es kann nur einer von ihnen maßgebend verantwortlich sein wie dies bei der fehlenden Inaktivierung von Renin beim nierenlosen Tier oder bei der verstärkten Reaktion auf adrenergische Wirkstoffe unter Cortexonüberdosierung der Fall ist.

Welche Bedeutung diesen beiden Mechanismen für die Pathogenese der Hypertension zukommt, ist auf Grund der heutigen Kenntnisse nicht zu entscheiden. Die beim Menschen festgestellte Zunahme der drucksteigernden Wirkung adrenergischer Substanzen unter Cortexon-Überdosierung (Raab 1950) zeigt, daß die Empfindlichkeit auf pressorische Reize unter bestimmten Bedingungen gesteigert sein kann, jedoch ist nicht bekannt, welche pathologischen Veränderungen einem derartigen Verhalten zugrunde liegen.

Die Bedeutung von Renin, Hypertensin oder anderen Peptiden für die Pathogenese der Hypertension ist bis heute unbekannt, und es kann daher auch nicht angegeben werden, ob und welche Bedeutung eine verminderte oder verzögerte Inaktivierung dieser Stoffe für die Entstehung oder Aufrechterhaltung eines pathologisch erhöhten Blutdruckes besitzt. Die heute vorliegenden Befunde bei der Hypertension des Menschen und beim chronisch experimentellen Hochdruck sprechen nicht dafür, daß eine einfache Zunahme von Renin oder anderen pressorischen Substanzen in den Nieren oder im Blut entweder infolge gesteigerter Produktion oder auf Grund verminderter Inaktivierung für die Aufrechterhaltung des Hochdruckes verantwortlich oder maßgebend daran beteiligt sind. Dagegen kann eine gesteigerte Empfindlichkeit auf an sich normale Mengen körpereigener pressorischer Stoffe, wie sie z. B.

durch Vorbehandlung mit Cortexon hervorzurufen ist, von wesentlicher Bedeutung für die Entstehung und für die Manifestierung einer Hypertension sein, besonders, wenn ein derartiger Zustand während langer Zeit andauert.

Summary

1. In the nephrectomised rat and in the rat overdosed with cortexone and salt comparative investigations have been performed on the intensity of the hypertensive reaction following the intravenous injection of adrenaline and nor-adrenaline, renin, natural and synthetic hypertensin, vasopressin, and ocytocin.

2. In the nephrectomised animal there is an increase of pressor response dependent on the dose for renin and the various peptides while no enhanced activity for the adrenergic substances has been found.

3. In the animals pretreated with cortexone and salt, pressor response to the adrenergic substances as well as to renin and the hypertensive peptides is increased, the maximal height of and relative increase in blood pressure being generally higher than in the nephrectomised rats.

4. Two mechanisms seem to be responsible for the increase in hypertensive activity of the substances examined:

a) a decrease in the inactivating capacity for renin and peptides, resulting either from extirpation of the kidney or from diminution of the content of pressor active material (renin?) in the kidney,

b) an increased sensitivity of the arterial system to hypertensive stimuli, probably due to a higher sodium, potassium and water content of the arterial and arteriolar wall.

5. The possible significance of these mechanisms for the pathogenesis of hypertension is discussed.

Literatur

Byrom, F. B., and C. Wilson: A plethysmographic method for measuring systolic blood pressure in the intact rat. J. Physiol. (Lond.) **93**, 301 (1938).

Dicker, S. E., and J. Nunn: Fate and excretion of the pressor activity of vasopressin in rats. J. Physiol. (Lond.) **138**, 11 (1957).

Folkow, B.: Structural myogenic, humoral and nervous factors controlling peripheral resistance. London: Hypotensive Drugs Symp. 1956, Harington, London.

Goldblatt, H., H. Lamfrom and E. Haas: Physiological Properties of Renin and Hypertensin. Amer. J. Physiol. **175**, 75 (1953).

Gross, F.: Experimentelle Methoden zur Beurteilung blutdrucksenkender Pharmaka. Naunyn-Schmiedeberg's Arch. exp. Path. Pharmak. **232**, 161 (1957).

Gross, F., u. F. Sulser: Wirkungsverstärkung von Renin und Nierenextrakt an der nierenlosen Ratte. Naunyn-Schmiedeberg's Arch. exp. Path. Pharmak. **229**, 338 (1956).

Gross, F., u. F. Sulser: Pressorische Substanzen in den Nieren experimentell hypertonischer Ratten. Naunyn-Schmiedeberg's Arch. exp. Path. Pharmak. **229**, 374 (1956).

Gross, F., u. H. Schmidt: Natrium- und Kaliumgehalt von Plasma und Geweben beim Cortexon-Hochdruck. Naunyn-Schmiedeberg's Arch. exp. Path. Pharmak. (im Druck).

Heller, H.: The metabolism and fate of the neurohypophyseal principles. The Neurohypophysis. Proc. of the Symp. of the Colston Research Society, p. 77. Bristol 1956.

Ledingham, J. M.: The influence of the adrenal on water and electrolyte disturbances following nephrectomy and its relation to renoprival hypertension. Clin. Sci. **13**, 535 (1954).

Masson, G. M. C.: Potentiation of pressor activity of subcutaneous renin. Fed. Proc. **13**, 95 (1954).

Masson, G. M. C., J. H. Page and A. C. Corcoran: Vascular reactivity of rats and dogs treated with desoxycorticosterone acetate. Proc. Soc. exp. Biol. (N. Y.) **73**, 434 (1950).

Masson, G. M. C., F. Del Greco, A. C. Corcoran and I. H. Page: Pressor Effects of subcutaneously injected Renin in Rats. Amer. J. Physiol. **180**, 337 (1955).

Raab, W., and R. H. Humphreys: Potentiation of pressor effects of nor-epinephrine and epinephrine in man by desoxycorticosterone acetate. J. clin. Invest. **29**, 397 (1950).

Rittel, W., B. Iselin, H. Kappeler, B. Riniker u. R. Schwyzer: Synthese von Hypertensin II-Peptiden. Angew. Chemie **69**, 179 (1957).

Silva, V., and H. Croxatto: Administracion de desoxycorticosterona y sensibilidad a la hipertensina y adrenalina en ratas. Acta physiol. lat.-amer. **1**, 46 (1950).

Silva, V., and H. Croxatto: The administration of desoxycorticosterone and the response in intact and adrenalectomized rats to renin and hypertensin. Rev. canad. Biol. **11**, 122 (1952).

Tobian, L., and J. Binion: Artery wall electrolytes in renal and DCA hypertension. J. clin. Invest. **33**, 1407 (1954).

Tobian, L., and P. D. Redleaf: Effect of hypertension on arterial wall electrolytes during desoxycorticosterone administration. Amer. J. Physiol. **189**, 451 (1957).

Dr. F. Gross, Forschungslaboratorium der Ciba AG., Pharmazeutische Abteilung, Basel/Schweiz

Arch. exper. Path. u. Pharmakol., Bd. 233, S. 338—342 (1958)

Pharmakologisches Institut der Medizinischen Universität, Pécs, Ungarn
(Direktor: Prof. Dr. Julius Méhes)

Wirkung von Pharmaka auf die Erregungsleitung am hypoxischen Herzen

Von
L. Szekeres

(Eingegangen am 19. September 1957)

Die unzulängliche Sauerstoffversorgung des Herzmuskels beeinflußt infolge des geänderten Myokardstoffwechsels die Tätigkeit des Herzens, seine grundlegenden physiologischen Eigenschaften, unter diesen auch die Erregungsleitung in erheblichem Maße. Andererseits hängt auch die Wirkung der Arzneimittel von dem augenblicklichen funktionellen Zustand des betroffenen Organs ab.

In dieser Arbeit wollten wir analysieren, ob der auch klinisch wichtige hypoxische Zustand des Herzmuskels die Wirkung einiger Pharmaka auf die Erregungsleitung abzuändern vermag. Pharmakologische oder physikalische Einflüsse auf die Erregungsleitung kommen nicht an allen Teilen des Herzens in gleichem Maße zur Geltung; auch ist die Geschwindigkeit der Erregungsleitung an verschiedenen Teilen des Herzens nicht dieselbe. Deshalb wurde in unseren Untersuchungen gleichzeitig die atrioventrikuläre Überleitungszeit und die intraventrikuläre Erregungsleitung beobachtet.

Methodik

Die Untersuchungen wurden an 10—15 kg schweren Hunden unter Morphin-Chloralose Narkose bei eröffnetem Thorax durchgeführt. Nach Durchtrennung beider Halsvagi wurde die Herztätigkeit mittels Elektrokardiographen in der II. Ableitung registriert. Die Änderungen der atrioventrikulären Überleitung wurden aus dem *PQ*-Intervall in Millisekunden, die der intraventrikulären Erregungsleitung aus der Breite des *QRS*-Komplexes ebenfalls in Millisekunden berechnet.

Die Tiere atmeten 10 min lang ein Gasgemisch von 7% O_2 + 93% N_2 ein. Die in den Tabellen angegebenen Werte der Erregungsleitung während der hypoxischen Periode wurden am Ende dieser Periode aufgezeichnet. Auf diesen Zeitpunkt beziehen sich auch die Werte für die arterielle Sauerstoffsättigung. Diese wurde in Blutproben aus der rechten Femoralarterie bestimmt.

Die Dosierung der untersuchten Arzneimittel wurde so gewählt, daß sie eine bereits abschätzbare, jedoch nicht zu große Änderung hervorrief. Die Blutgasanalyse wurde teils mit der manometrischen Methode von van Slyke, teils mit der photometrischen Methode von Wade u. Mitarb. durchgeführt.

Die statistische Analyse der Versuchsergebnisse erfolgte mit der „*t*" Methode von Student.

Versuche

a) Wirkung von Hypoxie. Carlen u. Katz beobachteten an denervierten Hundeherzen bei Asphyxie eine initiale Beschleunigung der atrioventrikulären Überleitung, dann eine Verlangsamung, schließlich trat ein totaler Block auf. Nach Behebung der Asphyxie normalisierte sich die atrioventrikuläre Überleitung bald. Harris u. Matlock berichteten über ähnliche Beobachtungen. In den an isolierten Kaninchenvorhofpräparaten durchgeführten Untersuchungen von Gardner u. Farah wurde die Erregungsleitung durch Hypoxie von Anfang an stufenweise herabgesetzt. Es zeigte sich jedoch nach Durchströmung der Nährlösung mit Sauerstoff eine völlige Restitution.

Tabelle 1. *Atrioventrikuläre und intraventrikuläre Erregungsleitung am Hundeherzen in situ bei Beatmung mit sauerstoffarmem (93% N_2 + 7% O_2) Gasgemisch*

PQ msec.			QRS msec			Arterielle O_2 Sättigung am Ende der hypoxischen Periode %
vor der hypoxischen Periode	am Ende der hypoxischen Periode	Differenz msec	vor der hypoxischen Periode	am Ende der hypoxischen Periode	Differenz msec	
70	75	5	30	40	10	
50	75	25	40	40	∅	39
30	50	20	30	50	20	65
65	80	15	40	60	20	
30	50	20	20	30	10	51
30	70	40	20	50	30	46
70	80	10	40	50	10	55
50	60	10	35	40	5	30
80	90	10	50	50	∅	37
60	80	20	30	40	10	
90	100	10	40	40	∅	43
50	70	20	40	50	10	
Mittel: 56,3	73,4	17,1	34,6	45,0	10,4	
	$n = 12$ $t = 6{,}39$ $P < 0{,}001$			$n = 12$ $t = 3{,}94$ $P \begin{matrix} > 0{,}001 \\ < 0{,}01 \end{matrix}$		

In unseren eigenen Versuchen beobachteten wir unter dem Einfluß von Hypoxie eine Verlängerung der Vorhofkammer-Überleitungszeit. Auch die intraventrikuläre Erregungsleitung wurde langsamer. (Tab. 1) Wir konnten die von anderen Autoren beschriebene anfängliche Steigerung der Erregungsleitung nicht beobachten.

b) Strophanthin. Die Wirkung von Herzglykosiden auf die Reizleitung äußert sich in erster Linie in der Hemmung der atrioventrikulären Überleitung (Straub W.). Auch die intraventrikuläre sowie die intraaurikuläre Erregungsleitung wird unter dem Einfluß von Herzglykosiden verlangsamt, wie es von De Boer an Froschherzkammern, von Sakai an isolierten Warmblüterherzohren beobachtet wurde.

In unseren Versuchen wurden bei reichlicher Sauerstoffversorgung die atrioventrikuläre und intraventrikuläre Erregungsleitung durch 30 γ/kg Strophanthin ebenfalls verlangsamt. Hypoxie verlängerte diese bereits gehemmte Erregungsleitung noch mehr. Auch die intraventrikuläre Erregungsleitung verlängert sich noch weiter in Hypoxie, jedoch nicht in signifikanter Weise (Tab. 2).

c) Adrenalin. Nach Carlen u. Katz beschleunigt *Adrenalin* an denervierten Hundeherzen in situ die atrioventrikuläre Überleitung erheblich, was durch Sympatholytica nicht beeinflußt werden kann.

Tabelle. 2. *Änderung der Strophanthinwirkung auf die atrioventrikuläre bzw. intraventrikuläre Erregungsleitung bei Beatmung mit Mangelgemischen von 7% O_2 in N_2*

PQ msec durch Strophanthin hervorgerufene Änderung			QRS msec durch Strophanthin hervorgerufene Änderung			Arterielle O_2 Sättigung am Ende der hypoxischen Periode
vor der hypoxischen Periode	am Ende der hypoxischen Periode	Differenz msec	vor der hypoxischen Periode	am Ende der hypoxischen Periode	Differenz msec	%
+ 20	+ 30	10	∅	∅	∅	39
+ 20	+ 20	∅	+ 10	∅	— 10	20
+ 10	+ 20	10	+ 10	+ 20	10	30
+ 20	+ 50	30	∅	+ 20	20	42
+ 20	+ 40	20	+ 30	+ 30	∅	
+ 5	+ 10	5	∅	+ 12	12	45
Mittel: + 15,8	+ 28,3	12,5	+ 8,36	+ 13,70	5,34	
	$n = 6$			$n = 6$		
	$t = 2{,}83$			$t = 1{,}22$		
	$P > 0{,}02$ $< 0{,}05$			$P > 0{,}20$ $< 0{,}50$		

In unseren Versuchen förderte Adrenalin (Einzelinjektionen von 2,5 γ/kg bzw. Dauerinfusionen von 2 γ/kg/min) bei normaler Sauerstoffversorgung sowohl die atrioventrikuläre als auch die intraventrikuläre Erregungsleitung. In der hypoxischen Periode kam diese Wirkung nicht zur Geltung; es zeigte sich vielmehr trotz Adrenalinbehandlung eine signifikante Verlängerung der Erregungsleitung (Tab. 3).

d) Acetylcholin. Acetylcholin hemmt an denervierten in situ Hundeherzen die atrioventrikuläre Überleitung; *Atropin* hebt diese Wirkung auf, *Eserin* verstärkt sie (Carlen u. Katz).

In unseren Versuchen wurde bei normaler Sauerstoffversorgung sowohl die atrioventrikuläre als auch die intraventrikuläre Erregungsleitung durch Acetylcholin (50—150 γ/kg) verlangsamt. Sauerstoffmangel verstärkte diese Hemmwirkung auf die atrioventrikuläre Überleitung, die intraventrikuläre Erregungsleitung konnte nicht signifikant beeinflußt werden (Tab. 4).

Tabelle 3. *Änderung der Adrenalinwirkung auf die atrioventrikuläre bzw. intraventrikuläre Erregungsleitung bei Beatmung mit Mangelgemischen von 7% O_2 in N_2*

PQ msec durch Adrenalin hervorgerufene Änderung			QRS msec durch Adrenalin hervorgerufene Änderung		
vor der hypoxischen Periode	am Ende der hypoxischen Periode	Differenz msec	vor der hypoxischen Periode	am Ende der hypoxischen Periode	Differenz msec
— 20	+ 20	40	— 20	∅	20
— 10	+ 10	20	∅	— 3	— 3
— 10	+ 20	30	— 20	∅	20
— 10	+ 20	30	— 10	+ 20	30
∅	+ 10	10	— 10	— 10	∅
— 10	+ 10	20	— 10	∅	10
— 10	+ 3	13	— 5	+ 3	8
Mittel: — 10	+ 13,3	23,5	— 10,7	+ 1,5	12,2

$n = 7$, $t = 5{,}80$, $P < 0{,}001$ — $n = 7$, $t = 2{,}73$, $P > 0{,}02 < 0{,}05$

Tabelle 4

Änderung der Acetylcholinwirkung auf die atrioventrikuläre bzw. intraventrikuläre Erregungsleitung bei Beatmung mit Mangelgemischen von 7% O_2 in N_2

PQ msec durch Acetylcholin hervorgerufene Änderung			QRS msec durch Acetylcholin hervorgerufene Änderung			Arterielle O_2 Sättigung am Ende der hypoxischen Periode
vor der hypoxischen Periode	am Ende der hypoxischen Periode	Differenz msec	vor der hypoxischen Periode	am Ende der hypoxischen Periode	Differenz msec	%
+ 9	+ 15	6	+ 5	∅	— 5	
∅	+ 10	10	+ 10	+ 20	10	45
+ 10	+ 30	20	+ 10	+ 20	10	54
+ 5	+ 5	∅	+ 5	+ 10	5	60
+ 5	+ 10	5	+ 10	+ 10	∅	
+ 10	+ 15	5	+ 5	+ 12	7	66
+ 10	+ 15	5	+ 5	∅	— 5	47
+ 10	+ 10	∅	+ 5	+ 5	∅	64
Mittel: + 7,38	+ 13,75	6,37	+ 6,87	+ 9,63	2,75	

$n = 8$, $t = 2{,}82$, $P > 0{,}02 < 0{,}05$ — $n = 8$, $t = 1{,}28$, $P > 0{,}20 < 0{,}50$

e) Nitroglycerin. Bei normaler Sauerstoffversorgung führte 5—20 μg/kg *Nitroglycerin* zu einer vorübergehenden Verlangsamung der atrioventrikulären und der intraventrikulären Erregungsleitung. Hypoxie verstärkte

die Hemmung der atrioventrikulären Überleitung signifikant, nicht jedoch die Änderung der intraventrikulären Erregungsleitung (Tab. 5).

Tabelle 5

Änderung der Nitroglyzerinwirkung auf die atrioventrikuläre bzw. intraventrikuläre Erregungsleitung bei Beatmung mit Mangelgemischen von 7% O_2 in N_2

PQ msec durch Nitroglyzerin hervorgerufene Änderung			QRS msec durch Nitroglyzerin hervorgerufene Änderung			Arterielle O_2-Sättigung am Ende der hypoxischen Periode
vor der hypoxischen Periode	am Ende der hypoxischen Periode	Differenz msec	vor der hypoxischen Periode	am Ende der hypoxischen Periode	Differenz msec	%
+ 10	+ 15	5	∅	∅	∅	66
+ 5	+ 10	5	+ 5	+ 10	5	55
+ 5	+ 10	5	+ 5	+ 5	∅	62
+ 10	+ 10	∅	+ 5	+ 5	∅	
+ 5	+ 10	5	+ 3	+ 6	3	73
+ 10	+ 10	∅	+ 3	+ 8	5	74
Mittel: + 7,50	+ 10,83	3,33	+ 3,50	+ 5,67	2,17	
	$n = 6$			$n = 6$		
	$t = 3{,}17$			$t = 2{,}17$		
	$P > 0{,}02$ $< 0{,}05$			$P > 0{,}05$ $< 0{,}10$		

Zusammenfassung

Es wurde die Dauer der atrioventrikulären sowie der intraventrikulären Erregungsleitung an Warmblüterherzen in situ unter dem Einfluß von Hypoxie beziehungsweise verschiedenen Arzneimitteln untersucht. Die Änderungen waren bei der atrioventrikulären wie auch bei der intraventrikulären Erregungsleitung von gleicher Richtung, jedoch zeigten sie sich bei dem ersteren stärker als bei dem letzteren. Hypoxie verlängerte die Erregungsleitung und beeinflußte die Wirkung verschiedener Arzneimittel auf die Erregungsleitung in bedeutendem Maße. So erschien die Wirkung von Acetylcholin, Strophanthin und Nitroglycerin, also von Erregungsleitunghemmenden Mitteln — in Hypoxie noch ausgeprägter, — während die Erregungsleitung beschleunigende Wirkung des Adrenalins durch Hypoxie stark gehemmt wurde.

Literatur

de Boer, S.: Pflügers Arch. **173**, 78 (1919).
Carlen, S .A., and L. N. Katz: Amer. J. Physiol. **127**, 272 (1939).
Gardner, E. A., and A. Farah: J. of Pharmacol. **111**, 255 (1954).
Harris, S., and P. W. Matlock: Amer. J. Physiol. **149**, 493 (1947).
Sakai, Sh.: Mitt. med. Fak. Tokyo, **19**, 245 (1918).
Straub, W.: Die Digitalisgruppe. — Heffters Hdbuch der exper. Pharmakologie II. Bd. 2, 1355—1452. Berlin: Julius Springer 1924.
Wade, O. L., J. M. Bishop, G. Cumming and K. W. Donald: Brit. Med. J. **4842**, 902 (1953).

Doz. Dr. L. Szekeres, Pharmakolog. Inst. d. Med. Univ. Pécs, Ungarn, Rákóczi nt. 2

Arch. exper. Path. u. Pharmakol., Bd. 233, S. 343—347 (1958)

Pharmakologisches Institut der Medizinischen Universität, Pécs, Ungarn
(Direktor: Prof. Dr. J. Méhes)

Empfindlichkeit der einzelnen Reizbildungszentren des Herzens gegenüber Kohlensäure und Hypoxie

Von
L. Szekeres, J. Faller und Gy. Lichner

Mit 3 Textabbildungen

(Eingegangen am 19. September 1957)

Es war schon den alten Naturforschern bekannt, daß nicht alle Teile des isolierten Herzens ihre Tätigkeit zur selben Zeit einstellen. Zuerst kommen die Herzkammern zum Stillstand, dann der linke und zuletzt der rechte Vorhof. Diese Beobachtung konnte damals nicht befriedigend erklärt werden. Später konnten Nowy u. Helmreich in ihren in vitro-Versuchen Unterschiede im Stoffwechsel einzelner Herzteile nachweisen. Herzmuskelschnitte aus Vorhöfen zeigten einen viel größeren Sauerstoffverbrauch als Schnitte aus den Kammern. Anitschkov beobachtete einen bedeutenden Unterschied in der Reaktion nomotoper und heterotoper Reizbildungszentren auf gewisse Pharmaka. Wir selbst (Szekeres, Lichner u. Varga) konnten zeigen, daß die rechte bzw. linke Herzkammer eine verschiedene Empfindlichkeit gegenüber Hypoxie besitzt.

Das Ziel unserer gegenwärtigen Arbeit war zu untersuchen, wie die höheren und tieferen Reizbildungszentren des Säugetierherzens auf Sauerstoffmangel und verschiedene Kohlensäurekonzentrationen reagieren. Es wurde die Reaktion des Sinusknotens, des atrioventrikulären Knotens und der „tertiären" Kammerreizbildung untersucht.

Methodik

In den Versuchen wurden nach Langendorff isolierte Kaninchen- und Katzenherzen verwendet.

Die Herztätigkeit wurde elektrokardiographisch registriert, wobei die einzelnen Elektrodenpaare am rechten Herzohr bzw. an der Kammerspitze angelegt wurden.

In einem Teil der Versuche wurden die Kontraktionen des rechten Herzohres und die der Kammerspitze mit Schreibhebeln kymographisch registriert.

Als Nährlösung diente bei einem Teil der Versuche reine Locke-Lösung — in anderen Versuchen wurden in Locke-Lösung gewaschene Rindererythrocyten (3:1) suspendiert.

Die Nährlösung wurde mit der gewünschten Gasmischung gesättigt. In den Versuchen, in denen eine elektrokardiographische Registrierung stattfand, wurden die Herzen mit Hilfe eines von Winterstein beschriebenen Apparates durchgeströmt. Wenn auch eine mechanische Registrierung der Herztätigkeit erforderlich war, wurde die Durchströmung des Herzens mit einem an anderer Stelle ausführlich

beschriebenen Apparat durchgeführt (Szekeres, Lichner u. Varga). In einem Teil der Versuche arbeitete das Herz in Stickstoffatmosphäre, was aber nach unseren Erfahrungen die Resultate der hypoxischen Versuche in keiner Weise beeinflußte.

Bei der Auswertung der Funktionsänderungen wurde das Verfahren von Anitschkov verwendet, d. h. die Veränderung der Eigenfrequenz der Vorhöfe und Kammern als Grad der Empfindlichkeit der Reizbildungszentren benutzt. Die Änderung der Vorhoffrequenz war für die Aktivität des Sinusknotens, die Änderung der Kammerfrequenz für die „tertiäre" Kammerreizbildung kennzeichnend. Die Änderungen der atrioventrikulären Reizbildung konnten nach Elektrokoagulation oder nach mechanischer Schädigung des Sinusknotens untersucht werden; die Führung übernimmt jetzt das atrioventrikuläre Reizbildungszentrum, und die Eigenfrequenz der Vorhöfe kann als Index der atrioventrikulären Reizbildung aufgefaßt werden.

Die Durchtrennung des Hisschen Bündels erfolgte nach Cohn u. Trendelenburg mit der Modifikation, daß zum Eindringen die Vena cava inferior benutzt wurde, wodurch das Einschneiden der Vorhofswand vermieden werden konnte. Bei erfolgreicher Durchtrennung beginnt die voneinander unabhängige Tätigkeit der Vorhöfe und der Kammern. Die Vollständigkeit der Durchtrennung wurde durch isolierte Erwärmung der Sinusgegend kontrolliert. — Bei vollkommener Durchtrennung des Hisschen Bündels wurde die nach Erwärmung auftretende Vorhoffrequenzsteigerung von den Kammern nicht übernommen. Ebenso war eine direkte elektrische Reizung der Sinusgegend, die an den Vorhöfen zu Extrasystolen führte, ohne Einfluß auf die Kammertätigkeit.

Die statistische Analyse der Versuchsergebnisse wurde mit Hilfe der „t"-Methode von Student durchgeführt.

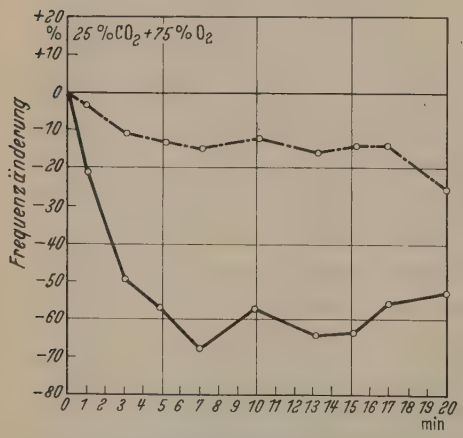


Abb. 1. Nach Langendorff isoliertes Kaninchenherz. Hissches Bündel durchtrennt. Abnahme der Vorhof- bzw. der Kammerfrequenz bei Durchströmung mit 25% CO_2 + 75% O_2 gesättigter Locke-Lösung. o—·—o Vorhof; o——o Kammer; (Frequenz in Prozent des Ausgangswertes)

Versuchsergebnisse

Im ersten Teil der Versuche wurde die Nährlösung mit verschiedenen CO_2 + O_2-Gasmischungen gesättigt. Bei Durchströmung des Herzens mit solchen Nährlösungen zeigte sich eine Verlangsamung der Herzschlagfolge, die nach unserer Erfahrung im allgemeinen in den ersten 5 min der Durchströmung ihren Tiefpunkt erreichte. Deshalb beziehen sich die in den Tabellen angegebenen Werte auf die fünfte Minute der Durchströmung.

Bei Durchströmung einer mit 10% CO_2 + O_2 gesättigten Nährlösung reagierten die Kammern mit einer durchschnittlichen Frequenzverminderung von 15,5%, während die Eigenfrequenz der Vorhöfe durchschnittlich nur um 6,5% herabgesetzt wurde. Jedoch ist die Differenz

Tabelle 1. *Langendorff-Herz, Hissches Bündel durchtrennt. Vorhof- und Kammereigenfrequenzverminderung bei Durchströmung mit Nährlösungen, die mit verschiedenen Gasmischungen gesättigt wurden*

Zahl der Versuche	Tierart	Nährlösung	Gasmischung	Frequenzverminderung in Prozent			t	p
				Kammer	Vorhof	Differenz		
6	Kaninchen	Locke	10% CO_2 +90% O_2	15,5	6,5	9,0	2,3	>0,05 <0,10
7	Kaninchen	Locke	20% CO_2 +80% O_2	36,0	19,2	16,8	3,32	>0,01 <0,02
5	Kaninchen	Locke	25% CO_2 +75% O_2	55,3	12,4	42,9	4,04	>0,01 <0,02
10	Katze	Rinder-erythrocyten-suspension	50% CO_2 +50% O_2	40,6	21,8	18,8	6,17	<0,001
5	Kaninchen	Locke	Stickstoff	40,8	15,4	25,4	3,5	>0,02 <0,05

zwischen Vorhof- und Kammerfrequenzverminderung nicht signifikant. 20% CO_2 in der Nährlösung rief bei den Kammern eine durchschnittlich 36%ige, bei den Vorhöfen nur eine 19%ige Frequenzverminderung hervor. Der Unterschied zwischen Vorhof- und Kammerfrequenzverminderung ist statistisch signifikant (Tab. 1). — Bei Anwendung von Nährlösungen mit 25% Kohlensäuregehalt ist dieser Unterschied noch größer. (Abb. 1, Tab. 1.)

Diese Ergebnisse zeigen, daß die tertiäre Kammerreizbildung mit einer bedeutend größeren Frequenzverminderung gegenüber Kohlensäure reagiert als die Sinusreizbildung. Je höher die CO_2-Konzentration der Durchströmungsflüssigkeit, desto größer ist der Unterschied zwischen Frequenzverminderung von Herzkammern und Vorhöfen.

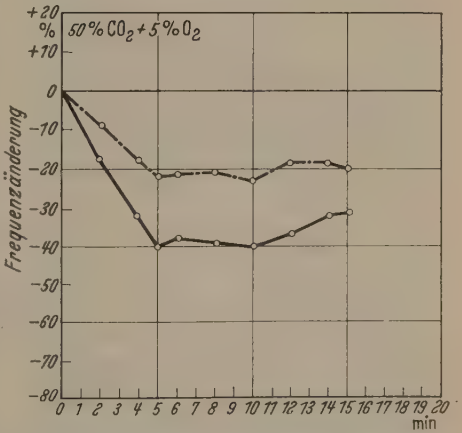


Abb. 2. Nach Langendorff isoliertes Katzenherz. Hissches Bündel durchtrennt. Abnahme der Vorhof- bzw. der Kammerfrequenz bei Durchströmung mit 50% CO_2 + 50% O_2 gesättigter Blutkörperchensuspension. o—·—o Vorhof; o——o Kammer; (Frequenz in Prozent des Ausgangswertes)

Diese Erscheinungen traten an Katzenherzen bei Anwendung von Blutkörperchensuspensionen als Nährlösung auch bei Sättigung mit 50% CO_2 + 50% O_2 in geringerem Maße auf (Abb. 2, Tab. 1).

Auch bei Sauerstoffmangel (Sättigung der Locke-Lösung mit reinem N_2) besteht ein Unterschied zwischen Vorhof- und Kammerfrequenzverminderung (Tab. 1). In einigen Fällen stellten sogar die Kammern ihre Tätigkeit ein, während die Vorhöfe höchstens eine 20—25%ige Frequenzverminderung zeigten.

Wenn nach Ausschaltung der Sinusreizbildung der atrioventrikuläre Knoten als Schrittmacher die Führung übernahm, reagierten die Vorhöfe in Hypoxie mit einer größeren Frequenzabnahme als vorher bei unversehrtem Sinusknoten, jedoch war diese Frequenzverminderung nicht so stark wie die der Kammern (Abb. 3).

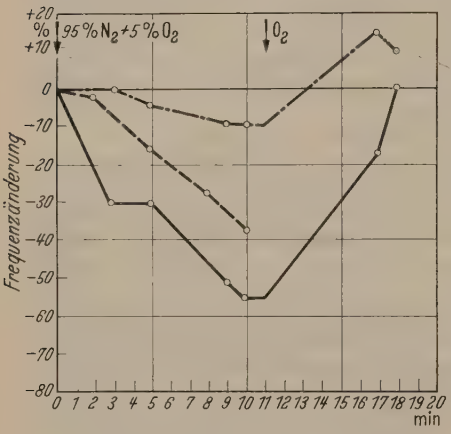


Abb. 3. Nach Langendorff isoliertes Kaninchenherz. Die Änderung der Sinus-atrioventrikulären und der Kammerreizbildung bei Durchströmung mit 95% N_2 + 5% O_2 gesättigter Locke-Lösung. Atrioventrikuläre Reizbildung (Tawara-Knoten) am gleichen Herzen nach Ausschaltung des Sinusknotens durch Elektrokoagulation. Mittelwerte aus 5 Versuchen; o——o Kammer; o—·—o Sinusknoten; o– – –o Tawara-Knoten; (Eigenfrequenz in Prozent des Ausgangswertes)

Besprechung der Ergebnisse

Auf Grund der obigen Versuchsergebnisse kann angenommen werden, daß die „tertiäre" Kammerreizbildung empfindlicher gegenüber Kohlensäureüberschuß oder Sauerstoffmangel reagiert als die Reizbildung des Sinusknotens. Die Empfindlichkeit des atrioventrikulären Knotens liegt zwischen diesen beiden.

Es kann die Frage gestellt werden, ob es sich hier um einen echten, mit der Spezifität von Struktur und Zellstoffwechsel erklärbaren Empfindlichkeitsunterschied handelt, oder ob nur einfache Diffusionsunterschiede zwischen Vorhof- und Kammermuskulatur die Ursache sind. Bei einer Abnahme des Sauerstoffgehaltes der Durchströmungsflüssigkeit mag die dickere Wand, die größere Muskelmasse der Kammern nachteilig wirken, während die Vorhöfe mit ihrer dünnen Wand und relativ großen Innenfläche eine Sauerstoffdiffusion von den Hohlräumen begünstigen.

Die Frage kann auf Grund dieser Untersuchungen nicht entschieden werden, es darf jedoch mit großer Wahrscheinlichkeit angenommen werden, daß es sich hier um einen wahren Empfindlichkeitsunterschied handelt. Für diese Annahme spricht teils die eigentümliche histologische Struktur der spezifischen Muskulatur, teils der verschiedene Glykogengehalt des atrioventrikulären Knotens bzw. der Purkinje-Fäden. In diesem Sinne können auch die Angaben von Howell sowie von Sakai gedeutet werden, daß die einzelnen Herzteile eine verschiedene Empfindlichkeit

gegenüber dem Chemismus des Milieusbesitzen. Die Tatsache, daß die zur Sauerstoffdiffusion in Betracht kommende relativ kleine Innenfläche der Herzkammern durch hypoxische Herzkranzgefäßerweiterung und bessere Durchblutung kompensiert werden kann, spricht gegen die Annahme, daß Diffusionsunterschiede eine bedeutende Rolle spielen. In nicht veröffentlichten Versuchen konnten wir beweisen, daß eine äußere N_2-Atmosphäre die Funktion des isolierten Herzens nicht beeinflußt. Es spielt also eine epikardiale Sauerstoffaufnahme für die Sauerstoffversorgung des Herzmuskels wohl keine Rolle. Es hält auch der Einwand, daß bei Durchtrennung des Hisschen Bündels die Blutversorgung der Kammern schwere Schäden erleide, nicht stand, da die isolierten Kammern bei guter Sauerstoffversorgung ihre Eigenfrequenz für lange Zeit behalten, was im Falle einer ernsten Blutversorgungsschädigung schwer zu erklären wäre. Durch diese Untersuchungen wird die alte Erfahrung, daß nämlich der rechte Vorhof das „Ultimum moriens" sei, unterstützt; andererseits weisen die Versuche darauf hin, daß in der Empfindlichkeit einzelner Herzteile gegenüber Hypoxie eine gewisse Reihenfolge besteht.

Zusammenfassung

Es wurde untersucht, mit welcher Empfindlichkeit die höheren und tieferen Reizbildungszentren des isolierten Herzens gegenüber Hypoxie sowie verschiedenen CO_2-Konzentrationen reagieren. Es konnte an isolierten Langendorff-Herzen, die nach Durchtrennung des Hisschen Bündels in totalen Block gerieten, festgestellt werden, daß die „tertiäre" Kammerreizbildung empfindlicher, d. h. mit stärkerer Verlangsamung der Herzschlagfolge reagierte als die Sinusreizbildung. Die Empfindlichkeit der atrioventrikulären Reizbildung liegt zwischen diesen beiden. Diese Ergebnisse unterstützen die alte Beobachtung, wonach der rechte Vorhof das „Ultimum moriens" sei, und stellen eine gewisse Reihenfolge in der Empfindlichkeit einzelner Herzteile gegenüber Hypoxie fest.

Literatur

Anitschkov, S. W.: Naunyn-Schmiedeberg's Arch. exper. Path. u. Pharmakol. **177**, 260 (1935).

Cohn, A. E., u. W. Trendelenburg: Pflügers Arch. **131**, 17 (1910).

Howell, W. H.: zit. nach R. Tiegerstedt: Die Physiologie des Kreislaufes. Berlin, Leipzig: Wissenschaft. Verlag 1921.

Nowy, H., u. E. Helmreich: Naunyn-Schmiedeberg's Arch. exper. Path. u. Pharmakol. **213**, 402 (1951).

Sakai, T.: Z. Biol. **64**, 539 (1914).

Szekeres, L., Gy. Lichner u. F. Varga: Acta physiol. (Budapest) **3**, Supp. 1952. Ausführlich: Archiv f. Kreislaufforsch. 1958 (im Druck).

Winterstein, H.: Abderhaldens Hdb. d. biol. Arbeitsmeth. Abt. V, Teil 4, 801.

Doz. Dr. L. Szekeres,
Pharmakologisches Institut der Medizinischen Universität Pécs, Ungarn, Rákóczi nt. 2

Arch. exper. Path. u. Pharmakol., Bd. 233, S. 348—354 (1958)

Pharmakologisches Institut der Medizinischen Universität, Pécs, Ungarn
(Direktor: Prof. Dr. Julius Méhes)

Einfluß von Arzneimitteln auf die Kontraktilität des Herzmuskels in Hypoxie

Von
L. Szekeres

Mit 1 Textabbildung

(Eingegangen am 11. September 1957)

Eine zuverlässige Registrierung der Kontraktilitätsänderungen des Herzens ist zum Erkennen pathologischer Zustände des Herzens, sowie für die Beurteilung pharmakologischer Wirkungen von Bedeutung.

Die Wirkung von Arzneimitteln hängt u. a. auch von dem funktionellen Zustand des betroffenen Organs ab. Wie bekannt, können schon Arzneimitteldosen die Organetätigkeit bei pathologisch veränderter Funktion beeinflussen, die unter normalen Umständen noch völlig unwirksam sind. (Zum Beispiel Herzglykosidwirkung auf das geschädigte Herz, Wirkung von Antipyreticis auf den fiebernden Organismus usw.) Bei zahlreichen klinisch gut definierten Krankheitsbildern spielt die mangelhafte Sauerstoffversorgung der Herzmuskelzellen eine zentrale Rolle, was auch die Herzwirkung einiger Pharmaka bedeutend abändern mag. Am Krankenbett begegnen wir meistens schon einer solchen modifizierten, von der am normalen Tier beobachteten Wirkung abweichenden Arzneimittelwirkung. Deshalb scheint unsere Problemstellung nicht nur vom theoretischen Standpunkt, sondern auch von dem Gesichtspunkt der Therapie aus gewisse Bedeutung zu haben. Wir haben die Wirkung einiger Pharmaka auf die Kontraktilität des Herzens unter dem Einfluß der Hypoxie studiert.

Methodik

Die Angaben über die Kontraktilität des Herzmuskels stammen größtenteils aus Versuchen, die an isolierten Herzteilen (Papillarmuskelpräparat, Kammerschnitt, isoliertes Vorhofspräparat), oder an isolierten Herzen, (Langendorff-Herz, Herz-Lungen-Präparat) durchgeführt wurden.

Am Herzen in situ können die Änderungen der Kontraktilität nur auf indirektem Wege: durch Untersuchung des Vorhofdrucks, des Minutenvolumens, des diastolischen Herzvolumens, des Herzschlagvolumens und besonders durch Analyse der intraventrikulären Druckkurven verfolgt werden.

Dabei ist es schwer zu bestimmen, wieweit die unter dem Einfluß von Arzneimitteln auftretende Kontraktilitätsänderung auf einer unmittelbaren Beeinflussung des Myokards, und in welchem Grade auf der Beeinflussung extrakardialer

Faktoren beruht. Deshalb ist die Wiedereinführung des fast vergessenen Myokardiographen in das Studium der Herzmuskelkontraktilitätsänderungen von großer Bedeutung. Der von CUSHNY beschriebene einfache Apparat registrierte ursprünglich nur die Amplituden der Herzkontraktionen. Er entwickelte sich später zum Tensiometer und wurde auf diese Weise auch für quantitative Messungen brauchbar, z. B. für die Auswertung pharmakologischer Einflüsse auf die Herzkontraktilität. In der Vervollkommnung dieses Registrierapparats und in der Ausbreitung seiner Anwendungsmöglichkeiten erwarben sich WALTON u. Mitarb. große Verdienste. Da aber die Registrierung bei dem von WALTON beschriebenen Tensiometer ebenso schwerfällig wie bei CUSHNYS Myokardiograph mit Faden und Rollentransmission ist, konstruierten wir einen Myokardiographen, dessen Behandlung und Eichung sich einfacher erwies als die des Fadentransmissionskardiographs.

Das Gerät wird in Abb. 1 dargestellt. Prinzipiell zeigt es Ähnlichkeit mit dem Myokardiographen zur optischen Registrierung von TENANT u. WIGGERS.

Es besteht aus einem fixen (R_K) und aus einem beweglichen Arm (M_K), der sich als Hebelarm um eine horizontale Achse dreht. Die Entfernung beider Hebelarme kann beliebig geregelt werden. An der Spitze beider befinden sich gespitzte Klemmen, die an zwei Punkten des Herzmuskels befestigt werden. Die Bewegungen des Hebelarms werden durch Gelenkübertragung einer Marey-Kapsel (d) übergegeben, deren Gummimembran mit einer Feder gespannt ist. Die Feder soll so dimensioniert sein, daß die Membran für 20—60 g Spannungswerte optimale Ausschläge gibt. Die Bewegungen der Membran werden mit Lufttransmission auf eine andere Marey-Kapsel übertragen und kymographisch registriert.

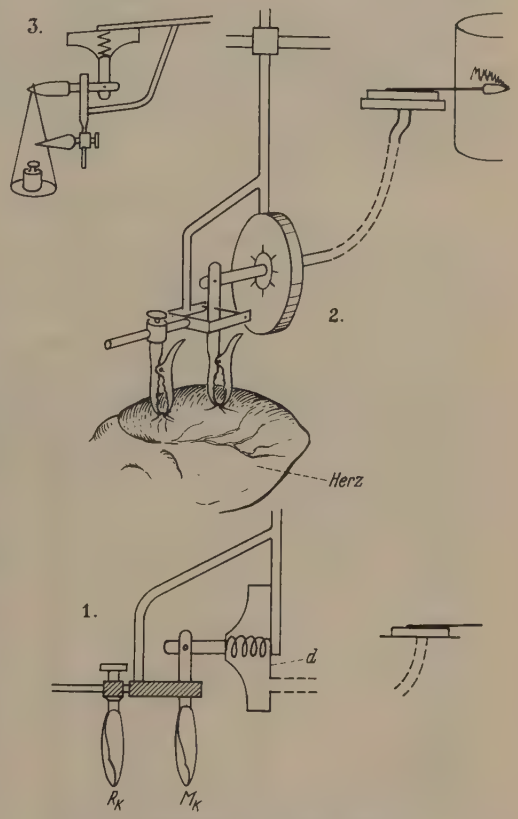


Abb. 1. Myokardiograph mit Lufttransmission

Zur Eichung wird das Gerät, wie aus dem Teil 3 der Abb. 1 ersichtlich, in vertikaler Lage fixiert. Auf den beweglichen Hebelarm wird eine kleine Aluminiumschale gehängt und mit verschiedenen Gewichten belastet. Der Schreibhebel registriert den einzelnen Gewichten entsprechend größere oder kleinere Ausschläge am berußten Papier. So kann die Kontraktionskraft des Herzmuskels unmittelbar in Grammwerten abgelesen werden.

Die Versuche wurden an 10—15 kg schweren Hunden in Morphin-Chloralose-Narkose durchgeführt. Der Brustkorb und das Perikardium wurden eröffnet, der Myokardiograph an der ventralen Fläche der rechten Herzkammer befestigt. Danach wurden beide Halsvagi durchgeschnitten.

In den Hypoxie-Versuchen atmeten die Tiere ungefähr 10 min lang eine Gasmischung von 7% O_2 + 93% N_2.

Die in den Tabellen mitgeteilten Kontraktilitätswerte, die sich auf die hypoxische Periode beziehen, wurden am Ende der Periode aufgezeichnet. Auch die Angaben über arterielle Sauerstoffsättigung beziehen sich auf diesen Zeitpunkt.

Die Dosierung der untersuchten Arzneimittel wurde so gewählt, daß sie eine mittlere Kontraktilitätsänderung von 15—30 g hervorriefen.

Die arterielle Sauerstoffsättigung wurde mit der manometrischen Methode von van Slyke, sowie mit der photometrischen Methode von Wade u. Mitarb. in Blutproben aus der rechten Femoralarterie bestimmt.

Die statistische Analyse der Versuchsergebnisse wurde mit Hilfe der „t"-Methode von Student durchgeführt.

Versuchsergebnisse

Die Kontraktilität des Herzmuskels zeigte unter dem Einflusse des Sauerstoffmangels zweierlei Reaktionen: bei einigen Versuchen verminderte sich die Kontraktionskraft des Herzens nach einer anfänglichen

Tabelle 1. *Die Wirkung der Beatmung mit Mangelgemischen von 7% O_2 in N_2 auf die Kontraktilität des Hundeherzens in situ*

Kontraktionskraft gr. vor der hypoxischen Periode	Kontraktionskraft gr. am Ende der hypoxischen Periode	Differenz	Kontraktilitätsänderung %	Arterielle O_2-Sättigung am Ende der hypoxischen Periode %
46	75	— 29	+ 63,0	
23	1	22	— 95,5	39
45	11	34	— 75,5	65
70	60	10	— 14,3	
36	3	33	— 91,7	51
35	6	29	— 83,0	46
26	22	4	— 15,4	55
52	60	— 8	+ 15,4	30
36	25	11	— 30,6	37
38	11	27	— 71,0	
42	31	11	— 26,2	43
32	11	21	— 65,7	
Mittel: 40,1	26,3	13,8	— 40,8	
	$n = 12$	$t = 2{,}93$		$P \begin{matrix} > 0{,}01 \\ < 0{,}02 \end{matrix}$

Steigerung, in anderen Versuchen kam aber sofort die Kontraktionsabnahme zur Geltung. Letzten Endes nahm die Kontraktilität des Herzmuskels im Vergleich mit der vorhypoxischen Periode in signifikanter Weise ab (Tab. 1).

Wenn die Tiere mit Sauerstoff gut versorgt waren, zeigte sich die bekannte positiv inotrope Wirkung des Strophanthins (30 μg/kg). In der

hypoxischen Periode zeigten jedoch auch die mit Strophantin behandelten Tiere eine signifikante Abnahme der Herzmuskelkontraktilität (Tab. 2). Die Strophanthinvorbehandlung konnte also die kontraktilitätsherabsetzende Wirkung der Hypoxie nicht verhindern.

Tabelle 2. *Strophanthinwirkung auf die Kontraktilität des Hundeherzens in situ bei Beatmung mit sauerstoffarmem Gasgemisch (7% O_2 + 93% N_2)*

Prozentuelle Änderung der Kontraktilität unter dem Einflusse von Strophantin			Arterielle O_2-Sättigung am Ende der hypoxischen Periode %
vor der hypoxischen Periode	am Ende der hypoxischen Periode	Differenz	
+ 47,2	— 40,9	88,1	39
+ 24,8	+ 31,8	— 7,0	20
+ 50,0	— 85,0	135,0	
+ 90,0	— 93,5	183,5	
+ 75,0	— 66,7	141,7	
+ 46,1	— 15,3	59,4	30
+ 1,6	— 5,2	6,8	45
Mittel: + 47,7	— 39,2	86,9	
$n = 7$	$t = 3,23$		$P > 0,01$ $< 0,02$

Tabelle 3. *Adrenalinwirkung auf die Kontraktilität des Hundeherzens in situ bei Beatmung mit sauerstoffarmem Gasgemisch (7% O_2 + 93% N_2)*

Prozentuelle Änderung der Kontraktilität unter dem Einfluß von Adrenalin			Arterielle O_2-Sättigung am Ende der hypoxischen Periode %
vor der hypoxischen Periode	am Ende der hypoxischen Periode	Differenz	
a) Einzelne Injektionen			
+ 54	+ 9	45	49
+ 77	0	77	23
+ 93	+ 67	26	
+ 41	+ 8	33	45
Mittel: + 66,3	+ 21,0	45,3	
$n = 4$	$t = 4,04$		$P > 0,02$ $< 0,05$
b) Dauerinfusion			
+ 390,0	+ 228,0	162,0	
+ 227,2	+ 71,5	155,7	
+ 100,0	— 53,3	153,3	
+ 133,5	— 55,5	189,0	
Mittel: + 212,7	+ 47,7	166,0	
$n = 4$	$t = 20,3$		$P < 0,001$

Adrenalin steigerte die Kontraktionskraft des Herzmuskels sowohl in Form von einzelnen Injektionen (1—10 µg/kg) wie auch in Form von Dauerinfusionen (2 µg/min) erheblich. Diese positiv inotrope Wirkung war unter dem Einfluß von Hypoxie bedeutend vermindert (Tab. 3).

Die negativ inotrope Wirkung von *Acetylcholin* (50—150 µg/kg) wurde durch Hypoxie noch gesteigert (Tab. 4).

Nitroglycerin (5—20 µg/kg) führte zu einer Abnahme der Herzmuskelkontraktilität, obwohl auf Grund der bekannten Steigerung der Kranz-

Tabell 4. *Acetylcholinwirkung auf die Kontraktilität des Hundeherzens in situ bei Beatmung mit sauerstoffarmem Gasgemisch (7% O_2 + 93% N_2)*

Prozentuelle Änderung der Kontraktilität unter dem Einfluß von Acetylcholin			Arterielle O_2-Sättigung am Ende der hypoxischen Periode %
vor der hypoxischen Periode	am Ende der hypoxischen Periode	Differenz	
— 8,5	— 27,4	18,9	60
— 16,0	— 24,2	8,2	
— 27,1	— 39,4	12,3	66
— 30,8	— 54,0	23,2	47
— 53,8	— 57,0	3,2	64
— 14,5	— 45,4	30,9	57
Mittel: — 25,1	— 41,2	16,1	
$n = 6$	$t = 3,87$		$P > 0,01$ $< 0,02$

Tabelle 5. *Nitroglycerinwirkung auf die Kontraktilität des Hundeherzens in situ bei Beatmung mit sauerstoffarmem Gasgemisch (7% O_2 + 93% N_2)*

Prozentuelle Änderung der Kontraktilität unter dem Einfluß von Nitroglycerin			Arterielle O_2-Sättigung am Ende der hypoxischen Periode %
vor der hypoxischen Periode	am Ende der hypoxischen Periode	Differenz	
— 32,4	— 53,0	20,6	66
— 38,4	— 51,2	12,8	50
— 32,2	— 60,0	27,8	55
— 34,9	— 51,8	16,9	62
— 23,8	— 28,5	4,7	
— 39,2	— 29,3	— 10,1	73
— 16,3	— 30,0	13,7	74
Mittel: — 31,0	— 43,4	12,4	
$n = 7$	$t = 2,54$		$P > 0,02$ $< 0,05$

gefäßdurchblutung sowie Abnahme der peripheren Resistenz eher eine Verbesserung der Herzmuskelkontraktilität zu erwarten wäre (Green). Sauerstoffmangel steigerte diese negativ inotrope Wirkung des Mittels noch weiter (Tab. 5).

Besprechung der Ergebnisse

Es konnte in diesen am Herzen des Hundes in situ durchgeführten Versuchen festgestellt werden, daß eine mangelhafte Sauerstoffversorgung des Herzmuskels die Kontraktionskraft desselben in erheblichem Maße

beeinflußt. Diese Angaben stimmen mit denen am isolierten Kaninchenherzohr gewonnen Ergebnissen von Gardner u. Farah, mit den an Langendorff-Herzen beobachteten Erscheinungen (König) sowie mit den am Herz-Lungenpräparat gewonnenen Ergebnissen von Rühl u. Thaddea überein.

Die kontraktilitätsfördernde Wirkung des *Adrenalins*, die sowohl an Papillarmuskelpräparaten (Di Palma u. Mascatello) als auch am Herzen in situ (Goldberg u. Mitarb.) zur Geltung kommt, wurde durch Hypoxie erheblich abgeschwächt, in einigen Fällen sogar aufgehoben. Wenn wir bedenken, daß Adrenalin sowohl am Kaltblüterherzen (Lichtneckert, ifj. Hetényi, ifj. Issekutz) wie auch am Warmblüterherzen (Gollwitzer Meyer u. Mitarb.) den Sauerstoffverbrauch des Herzmuskels in weit größerem Maße als die Arbeitsleistung steigert und damit den Wirkungsgrad der Herzleistung beträchtlich herabsetzt, so lassen diese Versuchsergebnisse eine gewisse Zurückhaltung in bezug auf die Anwendung dieses Mittels in hypoxischen Zuständen des Myokards angebracht erscheinen.

Strophanthin war nicht imstande die hypoxische Kontraktilitätsabnahme aufzuhalten; das unterstützt die von mehreren Autoren (Sommerkamp, König, Kisch u. Schwarz) vertretene Auffassung, daß eine therapeutische Herzglykosidwirkung bei Sauerstoffmangel nicht zustande kommt.

Die Frage, wie die bekannte günstige Wirkung der Herzglykoside bei verschiedenen Formen der Herzinsuffizienz, bei denen nach zahlreichen Autoren auch mit einem hypoxischen Faktor zu rechnen ist, auf Grund der besprochenen Angaben erklärt werden soll, kann wegen der Beschränktheit unserer Kenntnisse vom Mechanismus der verschiedenen Formen der Herzinsuffizienz nicht beantwortet werden. Wahrscheinlich kann auch die in unseren Versuchen angewandte hypoxämische Hypoxie nicht ohne weiteres mit der ischämischen Hypoxie der Herzinsuffizienz identifiziert werden.

Die negativ inotrope Wirkung von *Acetylcholin* und *Nitroglycerin* wurde durch Sauerstoffmangel noch weiter gesteigert. Nitroglycerin verdient in dieser Hinsicht besondere Aufmerksamkeit, da es hauptsächlich bei den mit schwerer Herzmuskelhypoxie einhergehenden Angina Pectoris Anfällen verwendet wird. Der bekannten vorteilhaften gefäßerweiternden Wirkung des Nitroglycerins, welche die Blutversorgung und den oxydativen Stoffwechsel des Herzmuskels verbessert, steht nämlich eine negativ inotrope Wirkung gegenüber. Diese wird jedoch durch den schweren akuten Sauerstoffmangel in den Hintergrund gedrängt. Auch auf Grund der jahrzehntelangen Erfahrungen der Kliniker ist wahrscheinlich, daß Nitroglycerin die Herzmuskelhypoxie mit ihren Folgen zu beheben imstande ist. Es soll aber betont werden, daß bei einer

Überdosierung außer dem infolge zu starker Gefäßerweiterung auftretenden Mißbehagen auch mit einer unvorteilhaften Wirkung des Nitroglycerins auf die Kontraktionskraft der Herzens zu rechnen ist.

Zusammenfassung

Es wurden mit Hilfe eines modifizierten Myokardiographen die Kontraktilitätsänderungen des Hundeherzens in situ während Hypoxie sowie unter dem Einfluß von Arzneimitteln (in der hypoxischen Periode verabreicht) untersucht. Hypoxie setzte nach mitunter kurzer anfänglicher Kontraktilitätssteigerung die Kontraktionskraft des Herzens bedeutend herab.

Bei normaler Sauerstoffversorgung zeigte sich nach *Strophanthin* eine positiv inotrope Wirkung, jedoch konnte dieses Mittel die kontraktilitätsschwächende Wirkung der Hypoxie nicht verhindern.

Die positiv inotrope Wirkung des *Adrenalins* wurde durch Hypoxie erheblich herabgesetzt oder sogar völlig aufgehoben.

Hypoxie verstärkte die negativ-inotrope Wirkung des *Acetylcholins* sowie die des *Nitroglycerins* erheblich.

Literatur

Cushny, A. R.: Brit. Heart J. **2**, 1 (1910).
Die Palma, J. L., and A. V. Mascatello: J. Pharmacol. a. Exper. Ther. **101**, 243 (1951).
Gardner, E. A., and A. Farah: J. Pharmacol. a. Exper. Ther. **111**, 255 (1954).
Goldberg, L. I., V. M. Cotten de, Th. D. Darby and E. V. Howell: J. Pharmacol. a. Exper. Ther. **108**, 177 (1953).
Gollwitzer Meyer, Kl., K. Kramer u. E. Krüger: Pflügers Arch. **239**, 639 (1936).
Green, H. P.: Amer. Assoc. Adv. Sci. Publ. **13**, 25 (1940).
Greiner, T.: J. Pharmacol a. Exper. Ther. **105**, 178 (1952).
Kisch, B., u. H. Schwartz: Arch. exper. Path. u. Pharmakol. **181**, 557 (1936).
König, W.: Arch. exper. Path. u. Pharmakol. **126**, 129 (1927).
Lichtneckert, J., ifj. G. Hetényi u. ifj. B. Issekutz: Kisérl. Orvostudom., Budapest **2**,161 (1950).
Rühl, A., u. S. Thaddea: Arch. exper. Path. u. Pharmakol. **191**, 452 (1939).
Sommerkamp, H.: Arch. exper. Path. u. Pharmakol. **124**, 248 (1927).
Tenant, R., u. C. J. Wiggers: Amer. J. Physiol. **122**, 351 (1935).
Wade, O. L., J. M. Bishop, G. Cumming and K. W. Donald: Brit. Med. J. **4842**, 902 (1953).
Walton, R. P., M. D. V. Cotten, A. H. Brill and P. C. Gazes: Amer. J. Physiol. **101**, 489 (1950).
Walton, P. R., and R. P. Gazes: South. med. J. **44**, 418 (1951).

Doz. Dr. L. Szekeres,
Pharmakol. Institut der Medizinischen Universität Pécs, Ungarn, Rákóczí nt. 2

Arch. exper. Path. u. Pharmakol., Bd. 233, S. 355—364 (1958)

Aus dem Pharmakologischen Institut der Universität Münster/Westf.
(Direktor: Prof. Dr. med. Dr. phil. A. Loeser)

Über die Bildung von Glucose und Glykogen aus 1,2-Propandiol in vitro*

Von
Klaus Opitz

(Eingegangen am 12. Dezember 1957)

Zu den Nichtkohlenhydraten, aus denen die Leber Glucose und Glykogen zu bilden vermag, gehört der zweiwertige Alkohol 1,2-Propandiol (1,2-Propylenglykol). Das geht aus Arbeiten von Hunt und Salter u. Mitarb. hervor. Auch Hanzlik u. Mitarb. stellten einen vermehrten Glykogengehalt in Leber und Gesamtkörper nach Verfütterung von 1,2-Propandiol bei Ratten fest. In diesen Versuchen vermochte 1,2-Propandiol bis zu 50% der Kohlenhydrate der Nahrung zu ersetzen. Junge Ratten, die 1,2-Propandiol an Stelle von Kohlenhydraten erhielten, wuchsen schneller und erreichten ein größeres Körpergewicht als Kontrolltiere. Den letzten Beweis für den Einbau von 1,2-Propandiol in Glykogenmoleküle erbrachte Rudney, der nach Verfütterung von markiertem 1,2-Propandiol (Propandiol-1-C^{14}) an Ratten das Isotop im isolierten Leberglykogen nachweisen konnte.

Die Möglichkeit, daß zugeführtes 1,2-Propandiol in den Kohlenhydratstoffwechsel eingeht, überrascht nicht, wenn neuere Arbeiten von Lindberg, Le Page, Sacks und Groth u. Mitarb. berücksichtigt werden, die den Phosphorsäureester dieses Alkohols (1,2-Propandiol-1-phosphat = PDP) als physiologischen Bestandteil verschiedener tierischer Gewebe nachgewiesen haben. Mit Hilfe der Isotopentechnik wurde die Rolle von PDP im Zwischenstoffwechsel untersucht (Sakami u. Lafaye; Miller u. Mitarb.; Rudney; Huggins u. Miller). Nach Rudney entsteht PDP im Organismus aus Aceton und geht teilweise in Ameisensäure + Essigsäure, teilweise in eine C_3-Verbindung des Glykolyse-Systems über. Auch Milchsäure und Brenztraubensäure können aus PDP entstehen, und zwar nach Miller u. Huggins über Monooxyacetonphosphat. PDP wird durch die *a*-Glycerophosphatdehydrogenase oxydiert (Miller u. Mitarb.).

Der schon länger bekannte Übergang von Glycerin in Kohlenhydrat bildet den Gegenstand vieler neuerer Untersuchungen (vgl. Cori u. Shine; Bernhard u. Wagner; Gidez u. Karnovsky; Teng u. Mitarb.; Teng; Renold u. Mitarb. 1956). Das bei der Verseifung der Fette frei werdende Glycerin wird phosphoryliert und über Dioxyacetonphosphat, Fructose-1-phosphat, Fructose-6-phosphat und Glucose-6-phosphat zu Glucose und Glykogen aufgebaut (vgl. Renold u. Mitarb. 1956).

Während die Bildung von Glucose und Glykogen aus Glycerin in der Leber intakter Tiere wie auch im Leberschnitt, also in vitro, vielfach

* Herrn Prof. Dr. Dr. W. Schulemann zum 70. Geburtstag.

nachgewiesen und auch hinsichtlich der einzuhaltenden Bedingungen (unverletzte Leberzellen, Anwesenheit von Sauerstoff, Zusammensetzung des Inkubationsmediums) eingehend untersucht wurde, ist über 1,2-Propandiol und seine Fähigkeit, in den Kohlenhydratstoffwechsel einzugehen, fast ausschließlich an intakten Tieren, meist Ratten, gearbeitet worden. Lediglich Rudney berichtete über Versuche mit Propandiol-1-C^{14} an Leberschnitten; das Isotop fand sich im Formiat und im Lactat, nicht im Cholesterin (keine Angabe über Glucose). Miller u. Mitarb. untersuchten den Einfluß von 1,2-Propandiol auf Sauerstoffverbrauch und Ketosäurebildung in Leberhomogenaten, Huggins u. Miller prüften die Wirkung von 1,2-Propandiol auf den Stoffwechsel von Hefezellen.

In der vorliegenden Arbeit wird über Versuche berichtet, ob und in welchem Ausmaß Leberschnitte von Ratten aus D,L-Propandiol-(1,2)[1] Glucose und Glykogen bilden. Die Wirkung von 1,2-Propandiol wurde stets mit der von Glycerin[2] verglichen. Außerdem wurden zwei weitere zweiwertige Alkohole (1,3-Propandiol[3] und 1,3-Butandiol[4]) sowie ein dreiwertiger Alkohol (1,2,4-Butantriol[5]) vergleichsweise untersucht. Dabei handelte es sich um Verbindungen, die sich vom 1,2-Propandiol bzw. Glycerin lediglich durch die Stellung der Hydroxylgruppen oder durch eine um ein C-Atom verlängerte Kohlenstoffkette unterscheiden. Außer den Versuchen an normalem wurden solche an geschädigtem Lebergewebe durchgeführt.

Methodisches

Grundsätzlich wurden bei allen Versuchen frühere, bei entsprechenden Untersuchungen mit Fructose und Glycerin gemachte Erfahrungen berücksichtigt. Durch zweckdienliche Vorbereitung der Versuchstiere (Hunger + Kälte) wurde der erforderliche gleichmäßig niedrige Leberglykogengehalt erzielt. Wegen der bekanntlich schnell einsetzenden postmortalen Glykogenolyse wurde die Leber rasch bei niedriger Raumtemperatur entnommen. Die Anfertigung der Leberschnitte, die wegen der ungleichmäßigen Verteilung des Glykogens in den einzelnen Leberlappen (vgl. Scheiff; Swensson) der Reihe nach auf die einzelnen Proben verteilt wurden, erfolgte ebenfalls bei tiefer Raumtemperatur. Die Zusammensetzung der Inkubationsflüssigkeit entsprach etwa dem Ionenmilieu des Zellinneren (vgl. Hastings u. Buchanan; Buchanan u. Mitarb.; Hastings und Mitarb.). Daß tatsächlich ausschließlich Glucose in den Medien bestimmt wurde, kann auf Grund der Befunde von Ashmore u. Mitarb. angenommen werden, die in glycerinhaltigen Inkubationsmedien von Leberschnitten außer Glucose, die mit Hilfe einer spezifischen Glucoseoxydase vollständig eliminiert werden konnte, keine anderen reduzierenden Stoffe fanden.

[1] 1,2-Propylenglykol Hoechst, Frankfurt/Main.

[2] Glycerinum bidestillatum pro analysi E. Merck, Darmstadt.

[3] 1,3-Trimethylenglykol rein Heyl & Co., Chem.-Pharm. Fabrik, Berlin-Steglitz und Hildesheim.

[4] 1,3-Butylenglykol rein Chemische Werke Hüls.

[5] 1,2,4-Butantriol rein Badische Anilin- und Sodafabrik, Ludwigshafen a. Rh.

Männliche Ratten von 250—350 g Körpergewicht wurden bei *Standard-Trockenfutter*[1] und Leitungswasser (beides ad libitum) gehalten. In allen Versuchen wurde den Tieren 24 Std vor Versuchsbeginn das Futter entzogen. Ein Teil der Versuchstiere verblieb während der ganzen 24 stündigen Fastenperiode bei 22—24° C Raumtemperatur, die Mehrzahl wurde aber während der letzten 15 Std vor Versuchsbeginn einer Lufttemperatur von + 5° C ausgesetzt („Kältetiere"). Alsdann wurden die Tiere dekapitiert und entblutet. Unmittelbar nach dem Töten wurden bei — 3° C mit Hilfe einer gehalterten Rasierklinge 2—3 g Leberschnitte von 0,3 bis 0,5 mm Stärke angefertigt und der Reihe nach auf 8 Proben verteilt. Die beiden ersten Proben wurden jeweils unverzüglich in heiße Kalilauge (30%) eingebracht und nach Ermittlung des Gewichtes — die Gefäße wurden vor und nach dem Einbringen der Leberschnitte gewogen — zur Glykogenbestimmung aufgearbeitet („Glykogenausgangswert" = Glykogengehalt aller Lebergewebsproben zu Versuchsbeginn in Milligramm Glykogen pro Gramm Leber, Feuchtgewicht). Die übrigen 6 Proben wurden in Inkubationsflüssigkeit von etwa 0° C eingebracht; diese enthielt die untersuchte Substanz (Probe 3 u. 4) bzw. eine Vergleichssubstanz (Probe 5 u. 6) oder sie war frei von Zusätzen (Probe 7 u. 8).

Es wurde das von Hastings u. Mitarb. angegebene Inkubationsmedium folgender Zusammensetzung verwendet: K^+ 110, Mg^{++} 20, Ca^{++} 10, Cl^- 130 und HCO_3^- 40 mMol/Liter. Die Substrate, d. h. die untersuchte Substanz oder die Vergleichssubstanzen, wurden in Konzentrationen von 60 mMol/Liter zugesetzt. Vor Versuchsbeginn wurden die Medien bei Raumtemperatur mit Carbogen (95 Vol-% O_2 + 5 Vol-% CO_2) gesättigt und hatten dann p_H-Werte um 7,5.

Nach der Gewichtsbestimmung wurden die Proben 3—8 für 90 min bei 38 ± 0,1° C im Thermostaten unter Schütteln inkubiert (Atmosphäre: Carbogen). Während der Inkubationsperiode entstand in den substratfreien Medien Glucose aus hydrolysiertem Glykogen, aber auch aus „unbekannten Vorstufen" (vgl. Renold u. Mitarb. 1953). In den übrigen Medien konnte zusätzlich Glucose und evtl. auch Glykogen aus dem jeweils zugesetzten Substrat gebildet werden.

Nach beendeter Inkubation wurden die Leberschnitte von den Medien getrennt und zur Glykogenbestimmung aufgearbeitet. Die Medien wurden mit Bariumhydroxyd + Zinksulfat enteiweißt; ihr Glucosegehalt wurde dann in einem aliquoten Teil bestimmt. Die Glykogenbestimmung erfolgte in Anlehnung an Good u. Mitarb.; dabei wurde die Fällung der sehr geringen Glykogenmengen durch Zusatz von Natriumsulfat nach Sjögren u. Mitarb. vervollständigt. Hydrolyse in Normalschwefelsäure 135 min bei 100° C. Die hierbei entstandene Glucose wurde ebenso wie die in den Medien enthaltene Glucose photometrisch nach Nelson und Somogyi bestimmt (Spektralphotometer Unicam, $\lambda = 550$ mμ). Aus dem Glucosewert ergibt sich der zugehörige Glykogenwert durch Multiplikation mit 0,925.

Bei einem Teil der Versuchstiere wurde eine hochgradige Leberschädigung mit Tetrachlorkohlenstoff erzeugt. Diese Tiere erhielten 24 Std ante mortem 5 cm³ CCl_4 in 20 cm³ Oleum olivarum DAB 6 pro Kilogramm durch die Schlundsonde; im übrigen war die Versuchsanordnung die gleiche, wie sie oben für „Kältetiere" beschrieben ist.

Berechnung der aus dem jeweiligen Substrat entstandenen *Glucose*menge: Von der Gesamtmenge der nach beendeter Inkubation in dem betreffenden Medium gefundenen Glucose wurden abgezogen:

[1] Hartgebäck aus 44,2% Maismehl, 33,2% Haferflocken, 8,2% Trockenhefe, 11,1% Trockenmagermilch, 2,2% Lebertran und 1,1% Salzgemisch nach McCollum und Simmonds (34,6 g Kochsalz, 69,4 g prim. Natriunphosphat, 190,8 g sec Kaliumphosphat, 108,0 g prim. Calciumphosphat, 23,6 g Ferricitrat, 260,0 g Calciumlactat und 52,2 g Magnesiumsulfat).

1. Die infolge Glykogenolyse während der Inkubationsperiode entstandene Glucosemenge (Glykogenausgangswert minus Glykogengehalt der Leberschnitte der betreffenden Probe am Ende der Inkubation, dividiert durch 0,925).

2. Die aus „unbekannten Vorstufen" entstandene Glucosemenge; diese Größe ergibt sich aus der in den substratfreien Medien bestimmten Glucosemenge abzüglich der in diesen „Leerversuchen" aus abgebautem Glykogen freigewordenen Glucose.

Die während der Inkubationsperiode (90 min) durch oxydativen Abbau verschwundene Glucose wurde nicht erfaßt; diese „veratmete" Zuckermenge fällt aber nach Goda, der Leberschnittversuche bis zu 8 Std ausdehnte, erst bei längeren Zeiten ins Gewicht.

Berechnung der aus Substrat entstandenen *Glykogen*menge: Glykogengehalt der Leberschnitte, die in Gegenwart des betreffenden Substrates inkubiert worden waren, minus Glykogengehalt der in subtratfreiem Medium inkubierten Schnitte.

Ergebnisse

In einer ersten Versuchsreihe wurde die Bildung von Glucose und Glykogen aus 1,2-Propandiol und Glycerin vergleichend untersucht.

Tabelle 1. *Bildung von Glucose und Glykogen aus 1,2-Propandiol (P) in vitro.* Vergleichssubstanz: Glycerin (G). „Kältetiere": K Glykogenausgangswert; L Leerversuch

A. Versuchsergebnisse

Vers. Nr.	Glucose (mg/g Leber)			Glykogen (mg/g Leber)			
	L	G	P	K	L	G	P
1	5,447	14,864	6,699	0,507	0,438	0,693	0,432
2	3,471	13,333	4,155	0,422	0,202	1,074	0,219
3	6,557	13,031	7,200	2,414	0,712	1,456	0,518
4	4,241	12,835	4,776	0,346	0,184	1,037	0,232
5	2,783	7,568	3,388	0,252	0,168	0,292	0,192
6	2,930	9,490	3,754	0,253	0,132	0,300	0,189
7	4,778	11,983	6,077	0,630	0,228	0,738	0,297
8	4,055	12,533	4,400	0,335	0,193	0,688	0,211
9	4,713	12,050	5,645	0,616	0,353	1,628	0,351
10	3,276	11,711	4,464	0,217	0,121	0,744	0,138

B. Berechnete Werte

Vers. Nr.	Glucosebildung (mg/g Leber)		Glykogenbildung oder -abnahme (mg/g Leber)	
	aus G	aus P	G	P
1	9,492	1,246	+ 0,255	— 0,006
2	10,100	0,703	+ 0,872	+ 0,017
3	7,278	0,433	+ 0,744	— 0,194
4	8,769	0,587	+ 0,853	+ 0,048
5	4,876	0,631	+ 0,124	+ 0,024
6	6,691	0,886	+ 0,168	+ 0,057
7	7,640	1,374	+ 0,510	+ 0,069
8	8,632	0,365	+ 0,495	+ 0,018
9	7,621	0,930	+ 1,275	— 0,002
10	8,539	1,207	+ 0,623	+ 0,017
Mittel	7,964	0,836	+ 0,592	+ 0,005

Tabelle 2. *Bildung von Glucose und Glykogen aus 1,2-Propandiol (1,2-P) und 1,3-Propandiol (1,3-P) in vitro*
K Glykogenausgangswert; L Leerversuch

A. Versuchsergebnisse

Vers. Nr.	Glucose (mg/g Leber)			Glykogen (mg/g Leber)			
	L	1,2-P	1,3-P	K	L	1,2-P	1,3-P
1*	3,115	4,395	2,473	0,293	0,171	0,189	0,154
2*	2,849	3,787	1,773	0,197	0,160	0,239	0,152
3*	2,943	3,186	2,037	0,250	0,126	0,129	0,132
4*	3,052	4,526	2,285	0,208	0,138	0,160	0,118
5*	3,883	4.960	3,966	0,252	0,128	0,117	0,127
6	4,818	5,796	3,998	0,435	0,224	0,216	0,200
7	4,627	4,983	4,160	0,507	0,293	0,231	0,209
8	5,175	5,903	4,103	0,361	0,194	0,200	0,216
9	5,673	5,923	4,390	0,547	0,278	0,252	0,233
10	4,720	4,940	3,415	0,388	0,226	0,218	0,220

B. Berechnete Werte

Vers. Nr.	Glucosebildung (mg/g Leber)		Glykogenbildung oder -abnahme (mg/g Leber)	
	aus 1,2-P	aus 1,3-P	1,2-P	1,3-P
1*	1,300	0,000	+ 0,018	— 0,017
2*	0,978	0,000	+ 0,079	— 0,008
3*	0,246	0,000	+ 0,003	+ 0,006
4*	1,498	0,000	+ 0,022	— 0,020
5*	1,065	0,082	— 0,011	— 0,001
6	0,969	0,000	— 0,008	— 0,024
7	0,289	0,000	— 0,062	— 0,084
8	0,735	0,000	+ 0,006	+ 0,022
9	0,222	0,000	— 0,026	— 0,045
10	0,211	0,000	— 0,008	— 0,006
Mittel	0,751	0,008	+ 0,001	— 0,018

* Versuche mit „Kältetieren".

Aus Tab. 1 ist ersichtlich, daß die Leberschnitte in allen Versuchen aus *beiden* Substraten Glucose gebildet hatten. Die Glucosebildung aus 1,2-Propandiol war allerdings — wie zu erwarten — wesentlich geringer als die aus Glycerin, das durchschnittlich etwa zehnmal mehr Glucose lieferte. Der Aufbau von Glykogen aus 1,2-Propandiol konnte unter den angegebenen Versuchsbedingungen nicht eindeutig nachgewiesen werden, wenn auch in 7 von 10 Versuchen eine geringfügige Glykogenvermehrung zu verzeichnen war. Demgegenüber entstand aus Glycerin regelmäßig Glykogen, doch wurde nur ein verhältnismäßig kleiner Teil der aus diesem Substrat gebildeten Glucose zu Glykogen aufgebaut, was den Ergebnissen von Renold u. Mitarb. (1956) entspricht.

Während der aus Versuchen am Ganztier bekannte Übergang von 1,2-Propandiol in Kohlenhydrat bei den beschriebenen Versuchen in vitro ebenfalls gefunden wurde, kommt dem isomeren 1,3-Propandiol eine zuckerbildende Wirkung offenbar nicht zu. Die Ergebnisse von Parallelversuchen mit beiden Propandiolen wurden in Tab. 2 zusammengestellt. In den Inkubationsmedien, die 1,3-Propandiol enthielten, fand sich in fast allen Versuchen weniger Glucose als in den substratfreien Medien der entsprechenden Leerversuche; 1,3-Propandiol hemmt also

Tabelle 3. *Bildung von Glucose und Glykogen aus 1,3-Butandiol (BD) und 1,2,4-Butantriol (BT) in vitro*
„Kältetiere": K Glykogenausgangswert; L Leerversuch

A. Versuchsergebnisse

Vers. Nr.	Glucose (mg/g Leber)			Glykogen (mg/g Leber)			
	L	BD	BT	K	L	BD	BT
1	5,281	4,550	5,406	0,538	0,221	0,212	0,218
2	4,168	—	4,956	0,404	0,212	—	0,243
3	6,180	5,503	6,589	0,766	0,423	0,326	0,357
4	5,449	4,891	5,527	0,538	0,348	0,284	0,321
5	6,120	5,531	6,330	0,780	0,288	0,286	0,344
6	4,751	4,054	4,930	0,491	0,299	0,302	0,329

B. Berechnete Werte

Vers. Nr.	Glucosebildung (mg/g Leber)		Glykogenbildung oder -abnahme (mg/g Leber)	
	aus BD	aus BT	BD	BT
1	0,000	0,122	— 0,009	— 0,003
2	—	0,822	—	+ 0,031
3	0,000	0,338	— 0.097	— 0,066
4	0,000	0,048	— 0,064	— 0,027
5	0,000	0,271	— 0,002	+ 0,056
6	0,000	0.212	+ 0,003	+ 0,030
Mittel	0,000	0,302	— 0,028	+ 0,004

anscheinend die Glucosebildung aus „unbekannten Vorstufen". Weiter geht aus Tab. 2 hervor, daß ein wesentlicher Unterschied zwischen den Ergebnissen von Versuchen mit und ohne zusätzliche Anwendung von Kälte bei der Vorbereitung der Versuchstiere nicht besteht; bei den Versuchen mit „Kältetieren" lagen die Glykogenausgangswerte etwas niedriger, und die aus 1,2-Propandiol gebildeten Glucosemengen waren etwas größer.

Ferner wurde geprüft, ob Leberschnitte auch aus 1,3-Butandiol und 1,2,4-Butantriol Glucose zu bilden vermögen, wie dies z. B. für einige organische Säuren mit vier Kohlenstoffatomen zutrifft (vgl. Breusch). Die Betrachtung von Tab. 3 ergibt, daß 1,3-Butandiol sich ähnlich wie

1,3-Propandiol verhält: es besitzt keine glucoplastischen Eigenschaften und beeinträchtigt anscheinend die Glucosebildung „aus X". Dagegen wurde in allen Versuchen eine geringfügige Glucosebildung aus 1,2,4-Butantriol festgestellt.

Da die Umwandlung von Glycerin in Glucose, wie bereits erwähnt, eine Funktion intakter Leberzellen darstellt, war zu erwarten, daß eine

Tabelle 4. *Bildung von Glucose und Glykogen aus Glycerin (G) durch normales und CCl_4-geschädigtes Lebergewebe in vitro*
„Kältetiere": K Glykogenausgangswert; L Leerversuch

A. Versuchsergebnisse

Vers. Nr.	Glucose (mg/g Leber) L	Glucose (mg/g Leber) G	Glykogen (mg/g Leber) K	Glykogen (mg/g Leber) L	Glykogen (mg/g Leber) G
	I. normales Lebergewebe				
1	1,723	6,085	0,283	0,276	0,240
2	3,029	9,363	0,289	0,430	0,409
3	3,164	7,597	0,384	0,210	0,266
4	4,121	8,734	0,602	0,452	0,400
5	2,936	6,391	0,910	0,624	0,964
	II. geschädigtes Lebergewebe				
1	1,852	3,157	0,455	0,181	0,303
2	1,250	3,441	0,429	0,224	0,374
3	0,368	2,182	0,227	0,253	0,495
4	1,450	4,390	0,229	0,225	0,259
5	1,250	2,573	0,414	0,170	0,301

B. Berechnete Werte

I. normales Lebergewebe

Vers. Nr.	Glucosebildung (mg/g Leber)	Glykogenbildung oder -abnahme (mg/g Leber)
1	4,324	— 0,036
2	6,334	— 0,021
3	4,493	+ 0,056
4	4,557	— 0,052
5	3,764	+ 0,340
Mittel	4,694	+ 0,057

II. geschädigtes Lebergewebe

Vers. Nr.	Glucosebildung (mg/g Leber)	Glykogenbildung oder -abnahme (mg/g Leber)
1	1,437	+ 0,122
2	2,354	+ 0,150
3	1,814	+ 0,242
4	2,944	+ 0,034
5	1,465	+ 0,131
Mittel	2,003	+ 0,136

hinreichend massive toxische Schädigung der Leber auch die entsprechende Verwertung von 1,2-Propandiol beeinträchtigen würde. Bei einem Teil der Versuchstiere wurde eine hochgradige Leberschädigung durch Tetrachlorkohlenstoff erzeugt. Die Leber dieser Tiere war ausnahmslos stark verfettet und bot bei mikroskopischer Betrachtung das bekannte Bild der schweren Tetrachlorkohlenstoffvergiftung. Derartig geschädigtes Lebergewebe wurde nun unter gleichen Bedingungen wie normale Leberschnitte in Gegenwart von Glycerin bzw. 1,2-Propandiol inkubiert.

Die Tab. 4 u. 5 geben einen Überblick über die Ergebnisse dieser Versuche. Die Fähigkeit zur Glucosebildung war bei den Versuchen mit Glycerin um mehr als die Hälfte reduziert, bei denen mit 1,2-Propandiol in 3 von 5 Fällen vollständig aufgehoben.

Tabelle 5. *Bildung von Glucose und Glykogen aus 1,2-Propandiol (P) durch geschädigtes Lebergewebe in vitro*
„Kältetiere": K Glykogenausgangswert; L Leerversuch

A. Versuchsergebnisse

Vers. Nr.	Glucose (mg/g Leber)		Glykogen (mg/g Leber)		
	L	P	K	L	P
1	1,109	1,043	0,191	0,209	0,204
2	1,471	2,047	0,313	0,291	0,277
3	1,904	2,061	0,234	0,256	0,260
4	1,885	1,858	0,229	0,303	0,226
5	2,309	2,274	0,294	0,309	0,285

B. Berechnete Werte

Vers. Nr.	Glucosebildung (mg/g Leber)	Glykogenbildung oder -abnahme (mg/g Leber)
1	0,000	— 0,005
2	0,561	— 0,014
3	0,157	+ 0,004
4	0,000	— 0,077
5	0,000	— 0,024
Mittel	0,144	— 0,023

Während also 1,2-Propandiol und 1,2,4-Butantriol ebenso wie Glycerin — wenn auch in weit geringerem Ausmaß — von Lebergewebe in vitro zum Aufbau von Glucose verwendet werden, sind 1,3-Propandiol und 1,3-Butandiol unter den gewählten Bedingungen nicht zuckerbildend, sondern beeinträchtigen sogar die Entstehung von Glucose aus „unbekannten Vorstufen" (im Lebergewebe enthaltene Milchsäure, Brenztraubensäure, glucoplastische Aminosäuren und ähnliches).

Die genannten zuckerbildenden Verbindungen sind ihrer chemischen Natur nach zwei- oder dreiwertige primär-sekundäre Alkohole, wobei jeweils mindestens zwei Hydroxylgruppen eine benachbarte Stellung im Molekül einnehmen. Letzteres trifft auch für Äthandiol zu, doch ist dieser diprimäre Alkohol kein Zuckerbildner (vgl. Breusch). Es hat den Anschein, daß nur solche zwei- oder dreiwertigen Alkohole in der Leber von Warmblütern zum Aufbau von Kohlenhydrat verwertet werden können, deren Kohlenstoffkette drei oder mehr C-Atome umfaßt und die wenigstens zwei benachbarte Hydroxylgruppen aufweisen, von denen eine endständig ist.

Werden die zuckerbildenden Eigenschaften der beiden isomeren Propandiole mit dem Grad ihrer Toxicität verglichen, so unterscheidet sich das nicht zuckerbildende 1,3-Propandiol auffallend durch seine größere Giftigkeit vom glucosebildenden 1,2-Propandiol. Auch Äthandiol gehört zu den toxischen Glykolen. Loeser u. Mitarb. haben erstmalig darauf hingewiesen, daß zwei- oder dreiwertige primär-sekundäre Alkohole durch geringe Toxicität gekennzeichnet sind, und man hat die Ungiftigkeit derartiger Verbindungen damit zu erklären versucht, daß sie vom Organismus als „carbohydratelike food" verwertet werden können (Grosskinsky u. Stürmer). Bei den Alkoholen mit vier Kohlenstoffatomen sind die Beziehungen zwischen Toxicität und der Fähigkeit, Glucose zu bilden, aber bereits unübersichtlich. So ist das beim Warmblüter nicht zuckerbildende 1,3-Butandiol[1] ebenso ungiftig wie das glucosebildende 1,2,4-Butantriol.

Zusammenfassung

1. Rattenleberschnitte bilden Glucose aus 1,2-Propandiol und 1,2,4-Butantriol, wenn auch in weit geringerem Ausmaß als aus Glycerin; unter den gleichen Bedingungen war eine Glykogenbildung nicht sicher nachweisbar.

2. Die Glucosebildung aus 1,2-Propandiol und Glycerin ist gebunden an die Unversehrtheit der Leberzelle. Die durch Tetrachlorkohlenstoff hervorgerufene Leberschädigung beeinträchtigt diese Leistung oder hebt sie auf.

3. 1,3-Propandiol und 1,3-Butandiol bilden unter den gewählten Bedingungen weder Glucose noch Glykogen.

Literatur

Ashmore, J., A. E. Renold, F. B. Nesbett and A. B. Hastings: J. biol. Chem. **215**, 153 (1955).
Bernhard, K., u. H. Wagner: Helv. chim. Acta **35**, 330 (1952); zit. n. Ashmore.
Breusch, F. L.: Stoffwechsel der Kohlenhydrate in Flaschenträger/Lehnartz: Physiol. Chem., Berlin 1954.
Buchanan, J. M., A. B. Hastings and F. B. Nesbett: J. biol. Chem. **180**, 435 (1949).
Cori, C. F., and W. M. Shine: Science **1935**, 134. — J. biol. Chem. **114**, XXI (1936).
Fischer, L., R. Kopf, A. Loeser und G. Meyer: Z. ges. exper. Med. **115**, 22 (1949).
Gidez, L. I., and M. L. Karnovsky: J. biol. Chem. **206**, 229 (1954).
Goda, T.: Biochem. Z. **294**, 259 (1937).
Good, C. A., H. Kramer and M. Somogyi: J. biol. Chem. **100**, 485 (1933).
Grosskinsky, L., u. E. Stürmer: Z. ges. exp. Med. **120**, 134 (1953).
Groth, D. P., G. A. Le Page, C. Heidelberger and P. A. Stoess: Cancer Res. **12**, 529 (1952); zit. n. Huggins and Miller.
Hanzlik, P. J., A. J. Lehman, W. van Winkle jr. and N. K. Kennedy: J. Pharmacol. exper. Ther. **67**, 114 (1939).

[1] Bei Versuchen an Froschlarven bewirkte 1,3-Butandiol eine deutliche Glykogenvermehrung (vgl. Opitz u. Loeser, Z. ges. exp. Med., im Druck).

Hastings, A. B., and J. M. Buchanan: Proc. Nat. Acad. Sci. (Wash.) **28**, 478 (1942); zit. n. Renold.
Hastings, A. B., C. T. Teng, F. B. Nesbett and F. M. Sinex: J. biol. Chem. **194**, 69 (1952).
Huggins, C. G., and O. N. Miller: J. biol. Chem. **221**, 719 (1956).
Hunt, R.: Industr. a. Engin. Chem. **24**, 361, 836 (1932); zit. n. Laug: J. industr. Hyg. **21**, 173 (1939).
Le Page, G. A.: Cancer Res. **8**, 197 (1948); zit. n. Rudney.
Lindberg, O.: Ark. Kemi. **16A**, 1 (1943); zit. n. Miller. **23A**, 1 (1946); zit. n. Rudney.
Miller, O. N., C. G. Huggins and K. Arai: J. biol. Chem. **202**, 263 (1953).
Nelson, N.: J. biol. Chem. **153**, 375 (1944); zit. n. Hoppe-Seyler/Thierfelder, Hdb. physiol. und pathol. chem. Anal. 10. Aufl., Berlin 1955, I/1 678.
Renold, A. E., J. Ashmore and A. B. Hastings: in Vitamins and Hormones, Vol. XIV, p. 140—186, New York 1956.
Renold, A. E., C. T. Teng, F. B. Nesbett and A. B. Hastings: J. biol. Chem. **204**, 533 (1953).
Rudney, H.: J. biol. Chem. **210**, 353, 361 (1954).
Sacks, J.: J. biol. Chem. **181**, 655 (1949).
Sakami, W., and J. M. Lafaye: J. biol. Chem. **193**, 199 (1951).
Salter, W. T., P. D. Robb and F. H. Scharles: J. Nutr. **9**, 11 (1935); zit. n. Laug: J. industr. Hyg. **21**, 173 (1939).
Scheiff, W.: Arch. ges. Physiol. **226**, 481 (1931).
Sjögren, B., T. Nordenskjöld, H. Holmgren und J. Möllerström: Arch. ges. Physiol. **240**, 427 (1938).
Somogyi, M.: J. biol. Chem. **160**, 61 (1945).
Swensson, Å.: Acta physiol. scand. **11**, Suppl. **33**, 158 (1945); zit. n. Flaschenträger/Lehnartz, Physiologische Chemie, II/2a p. 69 Berlin 1956.
Teng, C. T.: Arch. Biochem. **48**, 409 (1954); zit. n. Ashmore.
Teng, C. T., M. L. Karnovsky, B. R. Landau, A. B. Hastings and F. B. Nesbett: J. biol. Chem. **202**, 705 (1953).

Dr. K. Opitz, Pharmakologisches Institut der Univ. Münster/Westf., Westring 12

Arch. exper. Path. u. Pharmakol., Bd. 233, S. 365—375 (1958)

Aus dem Pharmakologischen Labor der Byk-Gulden Lomberg GmbH., Konstanz

Über Pyrazolidine und ihre pharmakologische Differenzierung*

Von

WOLFGANG SCHOETENSACK

(Eingegangen am 2. November 1957)

Die therapeutischen Möglichkeiten zur Behandlung rheumatischer Erkrankungen wurden durch die Einführung der 3,5-Dioxo-pyrazolidine erweitert. Trotz ihrer klinischen Bedeutung sind jedoch nur von wenigen Pyrazolidin-Derivaten die pharmakologischen Eigenschaften bekannt.

Die antipyretische Wirkung von Produkten dieser Verbindungsreihe wurde bereits 1898 von ROSER in den Farbwerken Hoechst am 1-Phenyl-2-methyl-3,5-dioxo-4,4-dimethyl-pyrazolidin erkannt und später von DOX sowie RUHKOPF an anderen 4,4-disubstituierten 3,5-Dioxo-pyrazolidinen beobachtet. In neuerer Zeit wurde von WILHELMI 1,2-Diphenyl-3,5-dioxo-4-n-butyl-pyrazolidin allein und in Kombination mit Aminophenazon (1-Phenyl-2,3-dimethyl-4-dimethylamino-pyrazolon) als besonders wirksam befunden. Nach HAAS u. KRAFT eignet sich ferner 1,4-Diphenyl-3,5-dioxo-pyrazolidin in Verbindung mit Aminophenazon und Diaethylaminoaethanol zur therapeutischen Anwendung. Außer mit den beiden letztgenannten Pyrazolidinen wurden pharmakologische und klinische Untersuchungen mit 1,2-Diphenyl-3,5-dioxo-4-(β-phenylthioaethyl)-pyrazolidin durchgeführt (BRODIE u. Mitarb.).

Von besonderer Bedeutung sind diejenigen — vornehmlich in 4-Stellung monosubstituierten — Pyrazolidin-Derivate, welche unter Enolisierung mit organischen und anorganischen Basen wasserlösliche Salze bilden; diese Salze ergeben mit geeigneten Pyrazolonen Lösungen, deren p_H eine parenterale Anwendung beider Komponenten erlaubt. Die Frage, ob derartige Lösungen qualitativ oder quantitativ veränderte pharmakologische Wirkungen im Vergleich zu ihren beiden Komponenten aufweisen, ist von praktischem wie auch von theoretischem Interesse. Experimentelle Untersuchungen hierüber liegen lediglich für die Kombination von Aminophenazon mit 1,2-Diphenyl-3,5-dioxo-4-n-butyl- (WILHELMI) und 1,4-Diphenyl-3,5-dioxo-pyrazolidin (HAAS u. KRAFT) vor. Während die gleichzeitige Verabreichung der beiden erstgenannten Pyrazole keine prinzipielle Änderung ihrer analgetischen, antipyretischen und antiphlogistischen Eigenschaften erkennen ließ, fanden HAAS u. KRAFT, daß Aminophenazon in Verbindung mit 1,4-Diphenyl-3,5-dioxo-pyrazolidin an der Maus einen weit stärkeren analgetischen und an der Ratte einen ausgeprägteren antiphlogistischen Effekt besitzt als der Summenwirkung der beiden Komponenten entsprechen würde.

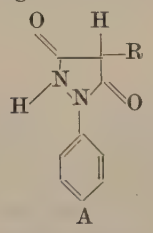
Einige orientierende Hinweise über den Einfluß verschiedener Substituenten auf die Toxicität sowie die analgetische und antipyretische Wirkung der 3,5-Dioxopyrazolidine bieten die Untersuchungen von BÜCHI, AMMANN, LIEBERHERR u. EICHENBERGER. Darüber hinaus liegen von den zahlreichen bekannten Pyrazolidin-Derivaten wenige und meist nur einzelne Eigenschaften beschreibende pharmakologische Angaben in der Literatur sowie in Patentschriften verteilt vor.

* Herrn Prof. Dr. Dr. W. NEUMANN zum 60. Geburtstag gewidmet.

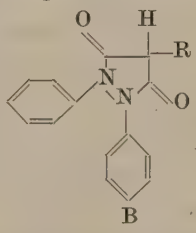
Ein Vergleich dieser Beobachtungen ist zudem schwierig, da sie vielfach mit verschiedenen Methoden erzielt wurden.

Mit vorliegender Arbeit wurde beabsichtigt, eine Reihe pharmakologischer Wirkungen zu beschreiben, die sich bei einer verschiedenen Substitution des Pyrazolidinmoleküls ergeben.

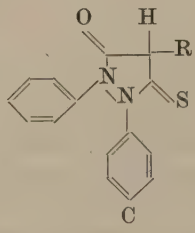
Aus einer größeren Reihe geprüfter Pyrazolidine wurden Derivate aus folgenden drei Gruppen gewählt:



A



B



C

1-Phenyl-3,5-dioxo-(A) *1,2-Diphenyl-3,5-dioxo-*(B) *1,2-Diphenyl-3-oxo-5-thion-*(C) *4-monosubstituierte Pyrazolidine*

Unter Ausnutzung der lösungsvermittelnden Eigenschaften der aufgeführten Pyrazolidine verfolgten wir deren pharmakologische Wirkung auch in Kombination mit Pyrazolonen.

Da die Untersuchungen an einer größeren Reihe von Pyrazolidinen unter vergleichbaren Bedingungen durchgeführt wurden, dürften die gemachten Beobachtungen eine eingehendere Vorstellung über die pharmakologischen Eigenschaften der Pyrazolidine auch nach gleichzeitiger Verabreichung mit Pyrazolonen vermitteln.

Als Vertreter der Pyrazolone schlossen wir neben *Aminophenazon* 1-Phenyl-2,3-dimethyl-4-isopropyl*amino*-pyrazolon *(Isopyrin)* in die Untersuchungen ein. Dieses Pyrazolon besitzt ähnliche analgetische und antiphlogistische Eigenschaften wie Aminophenazon, unterscheidet sich jedoch von diesem hinsichtlich seiner zentralen Wirkungen grundsätzlich. Während kleine Dosen von Aminophenazon bei Ratte und Maus Erregungserscheinungen und höhere bereits schwere Krämpfe auslösen, führen geringe Isopyrinmengen zu einer Einschränkung der Motilität und größere zu einem narkoseähnlichen Zustand. Der Antagonismus gegenüber erregenden Substanzen läßt die zentraldämpfenden Eigenschaften von Isopyrin eindrucksvoll hervortreten: bereits 22% (= 150 mg/kg) der nach intraperitonealer Gabe ermittelten DL 50 schützen Maus und Ratte vor dem tonischen Cardiazol- und tödlichen Nicotinkrampf. Darüber hinaus unterdrückt Isopyrin die durch Aminophenazon sowie durch 1,2-Diphenyl-3,5-dioxo-4-n-butyl-pyrazolidin und — wie nachfolgend beschrieben — auch die durch andere Pyrazolidine auslösbaren Krämpfe.

Methodik

1. Bestimmung der DL 50 an der Maus bei einmaliger i.v. Gabe (0,4—0,7 cm^3) nach Kärber, Injektionsdauer 10 sec. *Der zentrale Einfluß* der Substanzen wurde danach beurteilt, ob sie unterhalb der DL 50 Erregungserscheinungen oder Krämpfe auslösten.

2. Prüfung des antipyretischen Einflusses an Gruppen zu je 6 weiblichen Albino-Kaninchen von 2—4 kg. — Nach 3stündiger rectaler Temperaturkontrolle Fiebererzeugung durch Injektion von 1,5 γ/kg proteinfreier Lipopolysaccharide, gelöst in 1 cm³ 0,9%iger Kochsalzlösung, in die Ohrrandvene. Drei Tieren jeder Gruppe wurden etwa 1 min später zusätzlich 70 mg/kg der zu prüfenden Substanzen i.v. verabreicht. Die relativ hohe Dosis wurde gewählt, um schwächer antipyretische Effekte nicht zu übersehen. Anschließend während 240—300 min Temperaturmessung mittels Widerstandthermometer und automatische Registrierung durch einen Sechsfarbenschreiber. — Planimetrische Auswertung; durchschnittlicher Temperaturanstieg der Kontrollgruppen = 100%. Jedes Produkt wurde an mindestens 6 Kaninchen in zwei getrennten Versuchsreihen getestet. — Die pyrogenen Lipopolysaccharide wurden nach dem von Westphal, Lüteritz u. Bister angegebenen Verfahren aus Bact. coli gewonnen.

3. Antiphlogistischer Einfluß. Als Maß für die entzündungswidrigen Eigenschaften der nachfolgend beschriebenen Verbindungen diente deren Einfluß auf das *Eiweiß-*, das *Formalin-* und das *Hyaluronidaseödem* der Rattenhinterpfote.

Sprague-Dawley-Ratten beiderlei Geschlechts 100—220 g; Futter: käufliche Standard-Kost unter Zugabe von Grünfutter; Wasser nach Belieben.

Alle Ödeme wurden an *nicht-narkotisierten* Tieren ausgelöst. Zur Bestimmung des Pfotenvolumens diente ein bis zur Marke 4,7 abgeschliffener 5 cm³-Meßzylinder, der bis zu einer Markierung (3 cm³) mit einer 0,02%igen wäßrigen, durch Methylenblau angefärbten Cetylpyridiniumchloridlösung gefüllt war. Zur Messung wickelten wir die Ratten in ein Handtuch und tauchten die gestreckte linke Pfote jeweils soweit ein, bis sich das Tarsocruralgelenk mit der zweiten Markierung = 4,5 cm³ deckte; anschließend wurde aus einer Tuberkulinspritze mit Cetylpyridiniumchloridlösung bis zu dieser Markierung aufgefüllt. Das Pfotenvolumen errechnet sich aus: 4,5 — (3,0 + zugegebener Menge) = x cm³. An jeder Pfote wurden 3 Einzelmessungen durchgeführt und deren Ergebnisse gemittelt. Von den geprüften Substanzen wurden jeweils 150 mg/kg in die Muskulatur des rechten Beines injiziert.

Eiweißödem. Zur Ödemprovokation spritzten wir den Ratten 0,1 cm³ mit Wasser 1 : 10 verdünntes Albumen ovi siccum (Merck) subplantar. — Zu einer Versuchsreihe wurden gewöhnlich vier Gruppen zu je 6 Tieren zusammengestellt; während wir 3 Gruppen einheitlich 60 min vor der Eiweißapplikation die zu prüfenden Substanzen intramuskulär verabreichten, wurde einer Gruppe innerhalb *jeder Versuchsreihe* lediglich die 1 : 10 verdünnte Eiweißemulsion subplantar injiziert. Das Pfotenvolumen wurde 60 min nach der Ödemprovokation bestimmt. Die mittlere Pfotenschwellung der Versuchsgruppen in Kubikmillimeter wurde auf diejenige der jeweiligen Kontrollgruppe (= 100%) bezogen. Teilweise wurden dieselben Tiere in mindestens zehntägigem Abstand insgesamt dreimal verwendet.

Für die Erzeugung des Eiweißödems in der beschriebenen Weise waren einige nachfolgend zusammengefaßte Beobachtungen maßgebend.

Die von verschiedenen Autoren (Gross; Wilhelmi u. Domenjoz; Küchle u. Wegener; Bickhardt u. Heite; Bludau u. Heite u. a.) benutzte Methode, das Eiweißödem durch subplantare Injektion von nativem Hühnereiweiß hervorzurufen, erwies sich als nicht geeignet, den ödemhemmenden Einfluß von Pharmaka reproduzierbar zu bestimmen. Versuche an homogenen männlichen Ratten ergaben bei unvorbehandelten Kontrolltieren Differenzen der Pfotenschwellung von weit über 100%. In ähnlichem Ausmaß schwankte der ödemmindernde Einfluß verschiedener antiphlogistisch wirksamer Substanzen. Hingegen ließ sich bei Verwendung von 1 : 10 verdünntem Albumen ovi siccum nicht nur das Eiweißödem bemerkenswert gut reproduzieren, sondern auch die Schwankung der Versuchsergebnisse in wesentlich engeren Grenzen halten.

Die Pfotenschwellung mehr als einmal (60 min nach der Eiweißapplikation) zu bestimmen, war nicht erforderlich, da das Ödem — auch bei Tieren, die mit Antiphlogistica vorbehandelt worden waren — 30—45 min nach seiner Auslösung ein Maximum erreichte, welches für 2—3 Std bestehen blieb.

Ausschlaggebend dafür, daß wir erstens das Ausmaß der Pfotenschwellung nicht nach der prozentualen, sondern nach der absoluten Zunahme in Kubikmillimeter beurteilten und zweitens Tiere wiederholt verwendeten, waren die in Tab. 1 aufgeführten Beobachtungen. In ihr sind 306 Ratten (522 Einzelversuche)

Tabelle 1

Gruppe	Pfotenvolumen vor subplantarer Eiweißinjektion mm³ Gewicht der Tiere	Pfotenvolumenzunahme nach der I., II. und III. Eiweißapplikation					Durchschnittliche Volumenzunahme einer Gruppe		Durchschnittliche Pfotenschwellung in Prozent des Ausgangsvolumens
			n	mm³	σ	ε	n	mm³	
1	800	I	28	670	±62	±17	38	675	84
	(750—849)	II	6	690	±58	±23			
	110 g	III	4	700	±62	±31			
2	875	I	29	690	±54	±10			
	(850—899)	II	7	670	±64	±24	42	695	79
	120 g	III	6	730	±75	±31			
3	925	I	31	680	±78	±14			
	(900—949)	II	19	690	±78	±18	59	680	73,5
	134 g	III	9	680	±35	±12			
4	975	I	36	670	±85	±13			
	(950—999)	II	8	750	±48	±17	53	690	70
	145 g	III	9	700	±88	±29			
5	1025	I	51	660	±88	±12			
	(1000—1049)	II	25	700	±82	±16	99	670	65
	155 g	III	23	680	±101	±21			
6	1075	I	48	670	±101	±21			
	(1050—1099)	II	15	660	±75	±20	73	675	63
	165 g	III	10	720	±98	±31			
7	1125	I	41	670	±88	±14			
	(1100—1149)	II	21	700	±70	±15	83	670	60
	177 g	III	21	660	±73	±16			
8	1200	I	42	660	±98	±15			
	(1150—1249)	II	17	710	±79	±19	75	690	58
	198 g	III	16	750	±89	±23			

nach ihren Pfotenvolumina geordnet in 8 Gruppen unterteilt. Wie ersichtlich, besteht eine Korrelation zwischen dem Pfotenvolumen und dem Gewicht der Tiere; einem Gewichtszuwachs von 22 g entspricht eine durchschnittliche Zunahme des Pfotenvolumens von 100 mm³. Auffälligerweise nimmt das Ausmaß der Ödembildung nicht entsprechend dem steigenden Pfotenvolumen zu, sondern ist — bezogen auf die Durchschnittswerte — bei allen 8 Gruppen annähernd gleich groß. Dieses bemerkenswerte Verhalten ist darauf zurückzuführen, daß die Tiere mit steigendem Gewicht, d. h. mit zunehmendem Alter, schwächer auf die Eiweißapplikation reagieren. Die Empfindlichkeitsabnahme ist bei Tieren mit einem

Gewicht von 110—155 g besonders ausgeprägt (siehe Tab. 1, letzte Rubrik). Anfänglich benutzte Wistar-Ratten wiesen ein ähnliches Verhalten auf. Die Pfotenschwellung in Prozent des Ausgangswertes zu beurteilen ist somit nicht erforderlich und kann im Gegenteil bei Verwendung von Tieren mit größerem Gewichtsunterschied die Fehlerbreite der Methode erheblich vergrößern. — Insgesamt ergab sich nach der 1., 2. und 3. Eiweißapplikation eine durchschnittliche Pfotenschwellung von 670 mm^3 (306 Tiere), 695 mm^3 (118 Tiere) und 705 mm^3 (98 Tiere). Dieser geringen Empfindlichkeitszunahme wurde durch Verwendung von Kontrollgruppen innerhalb jeder Versuchsreihe Rechnung getragen. Eine verschiedene Beeinflussung der Ödembildung durch Pharmaka nach wiederholter Eiweißapplikation konnte nicht beobachtet werden. Die Streuung (σ) der Pfotenschwellungen bei den Kontrollgruppen betrug im Durchschnitt (Mittelwert aus 86 Kontrollgruppen) $\pm$ 8,3% und die durchschnittliche Abweichung vom Mittelwert (ε) = $\pm$3,4%. — Unter den geschilderten übersehbaren Versuchsbedingungen ließ sich das Eiweißödem — bei angemessenem zeitlichen und materiellen Aufwand — auf einfache Weise routinemäßig durchführen.

Formalinödem. Auslösung durch subplantare Injektion von 0,1 cm^3 einer 3%igen Formalinlösung, Messung des Pfotenvolumens 30, 60, 90, 120 min nach der Ödemprovokation. Bestimmung des durchschnittlichen protektiven Einflusses aus der Summe der zu den vier Zeiten ermittelten Werte. Für jede Substanz wurden 12—18 und zur Kontrolle 24 Tiere angesetzt.

Hyaluronidaseödem. Auslösung des Ödems durch subplantare Applikation von 0,3 cm^3 einer Hyaluronidaselösung, die je Kubikzentimeter 3 IE enthielt. Bestimmung des Pfotenvolumens 10, 20, 30, 40, 60, 90 u. 120 min nach der Hyaluronidaseapplikation. Der durchschnittliche protektive Einfluß wurde analog zu dem Vorgehen beim Formalinödem an je 12 Ratten ermittelt.

Ergebnisse

In Tab. 2 sind die letalen Dosen sowie der krampfauslösende, antipyretische und ödemmindernde Einfluß von Aminophenazon (I) und Isopyrin (II) gegenübergestellt. II ist weniger toxisch als I und wirkt — wie oben erwähnt — im Gegensatz zu I nicht krampfauslösend; das Coli-Fieber des Kaninchens wird durch II (70 mg/kg i.v.) etwas schwächer gehemmt als durch I. Der ödemhemmende Einfluß von II (150 mg/kg i.m.) ist im Vergleich zu I am Eiweiß- und Formalinödem stärker, am Hyaluronidaseödem etwas schwächer ausgeprägt.

A. 4-monosubstituierte 1-Phenyl-3,5-dioxopyrazolidine

Die Verbindungen dieser Reihe (Tab. 3) lassen insofern einen Zusammenhang zwischen Konstitution und Wirkung erkennen, als die akute Toxicität der n-Alkyl-Derivate mit zunehmender Kettenlänge von der n-Butyl- bis zur n-Octyl-Verbindung an der Maus um nahezu das 10fache zunimmt. DL 50 von n-Hexyl- und n-Octyl- = 160 und 80 mg/kg. — Das n-Amyl- und Cyclohexyl-Derivat wirkt auf die Maus erregend.

Keine Substanz besitzt am Kaninchen einen nennenswerten antipyretischen Einfluß. Während das Eiweißödem von den geprüften Derivaten kaum beeinflußt wird, wird das Formalinödem durch die n-Butyl- und Isopropyl-, das Hyaluronidaseödem durch die n-Butyl- und Benzyl-Verbindung deutlich gehemmt.

Tabelle 2

	Maus		Kaninchen	Ratte								
				Eiweißödem			Formalinödem			Hyaluronidaseödem		
	DL 50 mg/kg i.v.	Erregung = E Krampf = K	Fieberhemmung %	Gruppen zu 6 Tieren	Protekt. Einfluß %	P	Tiere	Protekt. Einfluß %	P	Tiere	Protekt. Einfluß %	P
1-Phenyl-2,3-dimethyl-4-dimethylamino-pyrazolon	190	K	130	6	37	$< 0{,}001$	12	34	$< 0{,}001$	12	44	$< 0{,}001$
1-Phenyl-2,3-dimethyl-4-isopropylamino-pyrazolon	370	0	103	8	43	$< 0{,}001$	12	46	$< 0{,}001$	12	39	$< 0{,}001$

Anm. zu Tab. 2—5: Von den einzelnen Pyrazolidinen wurden zur Prüfung des fieberhemmenden Einflusses 70 mg/kg i.v. und zur Ermittlung des protektiven Einflusses auf das Eiweiß-, Formalin- und Hyaluronidaseödem einheitlich 150 mg/kg i.m. verabfolgt. Diese Dosen beziehen sich auch auf die Gesamtmenge, welche bei Kombination der Pyrazolidine mit Pyrazolonen verabreicht wurde. — Die P-Werte — ermittelt nach dem t-Verfahren — geben die Signifikanz gegenüber den Kontrollen an.

Nach Verabreichung der 4-monosubstituierten 1-Phenyl-3,5-dioxopyrazolidine mit gleichen Gewichtsteilen I bzw. II wurden folgende Beobachtungen erzielt:

Mit Ausnahme der n-Amyl- u. Cyclohexyl-Verbindung führt — bezogen auf die Summe von halber DL 50 der Pyrazolidine und halber DL 50 von I bzw. II — die i.v. Injektion der Pyrazolidinabkömmlinge mit I zu einer Steigerung und diejenige mit II zu einer Herabsetzung der akuten Toxicität. Der antipyretische Effekt der Pyrazolidine ist in Kombination mit I allein auf den Anteil von I (35 mg/kg i.v.: Fieberhemmung = 85 %) zurückzuführen; derjenige des schwächer antipyretisch wirksamen II (35 mg/kg i.v.: Fieberhemmung = etwa 30%) erfährt in Verbindung mit dem n-Butyl- bzw. Cyclohexyl-Derivat eine deutliche Verstärkung. — Der zentral-erregende Einfluß der Pyrazolidine wird durch Zugabe von I verstärkt, in Kombination mit II jedoch abgeschwächt.

Der protektive Einfluß auf das Eiweißödem tritt insbesondere bei Kombination der n-Butyl- bzw.

Tabelle 3. *4-monosubstituierte 1-Phenyl-3,5-dioxo-pyrazolidine*

I = 1-Phenyl-2,3-dimethyl-4-dimethylamino-pyrazolon; II = 1-Phenyl-2,3-dimethyl-4-isopropylamino-pyrazolon

— R	Maus		Kaninchen	Ratte								
				Eiweißödem			Formalinödem			Hyaluronidaseödem		
	DL 50 mg/kg i.v.	Erregung = E Krampf = K	Fieber-hemmung %	Gruppen zu 6 Tieren	Protekt. Einfluß %	P	Tiere	Protekt. Einfluß %	P	Tiere	Protekt. Einfluß %	P
-isopropyl	820	0	0	2	14	$< 0{,}01$	12	25	$< 0{,}01$	12	11	$> 0{,}4$
,, +I	270	K	75	2	15	$< 0{,}01$	12	34	$< 0{,}001$	12	18	$> 0{,}05$
,, +II	690	0	30	2	25	$< 0{,}001$	12	35	$< 0{,}001$	12	23	$> 0{,}05$
-n-butyl	600	0	0	2	15	$< 0{,}01$	12	36	$< 0{,}001$	12	23	$< 0{,}02$
,, +I	275	K	84	3	19	$< 0{,}01$	18	37	$< 0{,}01$	12	34	$< 0{,}01$
,, +II	500	0	63	3	30	$< 0{,}001$	12	46	$< 0{,}001$	12	43	$< 0{,}01$
-amyl	210	E	0	2	12	$< 0{,}02$	12	25	$< 0{,}01$	12	9	$> 0{,}3$
,, +I	225	K	85	2	20	$< 0{,}001$	12	36	$< 0{,}001$	12	36	$< 0{,}001$
,, +II	280	0	40	2	20	$< 0{,}001$	12	43	$< 0{,}001$	12	22	$< 0{,}01$
-cyclohexyl	240	E	22	2	17	$< 0{,}01$	—	—	—	—	—	—
,, +I	220	—	87	2	18	$< 0{,}05$	—	—	—	—	—	—
,, +II	300	—	63	2	26	$< 0{,}001$	—	—	—	—	—	—
-phenyl	740	0	10	2	11	$> 0{,}05$	12	6	$> 0{,}8$	—	—	—
,, +I	310	K	90	2	13	$< 0{,}01$	12	23	$< 0{,}01$	—	—	—
,, +II	570	0	42	3	22	$< 0{,}001$	12	30	$< 0{,}001$	—	—	—
-benzyl	440	0	0	3	15	$< 0{,}01$	12	20	$> 0{,}5$	12	29	$< 0{,}05$
,, +I	220	E	85	3	21	$< 0{,}01$	12	32	$< 0{,}001$	12	18	$< 0{,}02$
,, +II	650	0	25	3	25	$< 0{,}001$	12	29	$< 0{,}02$	12	15	$> 0{,}2$

Cyclohexyl-Verbindung mit II hervor, erreicht aber in keinem Fall die Wirkung analoger Mengen von I oder II. Das Formalinödem wird durch das Isopropyl-, n-Butyl- und Amyl-Derivat in Verbindung mit I bzw. II in ähnlichem Umfang wie durch die beiden Pyrazolone gehemmt; am Hyaluronidaseödem wirkt die n-Butyl-Verbindung zusammen mit I bzw. II und das Amyl-Derivat in Kombination mit I deutlich.

An der n-Butyl-Verbindung konnten Büchi u. Mitarb. ebenfalls keine antipyretischen Eigenschaften ermitteln. Während unsere Beobachtungen über die toxische und antipyretische Wirkung des Phenyl-Derivates auch in Kombination mit I mit den von Haas u. Kraft erzielten übereinstimmen, fanden wir am Eiweiß- und Formalinödem wesentlich schwächere Hemmeffekte. Möglicherweise sind die differierenden Ergebnisse darauf zurückzuführen, daß die Autoren nicht die räumliche Pfotenschwellung, sondern die Zunahme der Breite des Tarsocruralgelenkes als Maß benutzten. Nach unseren Erfahrungen ist der Einfluß von Pharmaka auf die durch subplantare Eiweiß- oder Formalinapplikation hervorgerufene Gelenkschwellung nicht mit deren Wirkung auf die absolute Pfotenschwellung vergleichbar.

B. 1,2-Diphenyl-3,5-dioxo-pyrazolidine

Die Anlagerung einer zusätzlichen Phenyl-Gruppe an das zweite Stickstoffatom führt zu Verbindungen, die einerseits toxischer und ausgeprägter krampfauslösend, andererseits jedoch wesentlich stärker antipyretisch und antiphlogistisch wirksam sind (Tab. 4).

Neben dem stark wirksamen n-Butyl-Derivat besitzt noch die Cyclohexyl-Verbindung einen deutlichen antipyretischen Einfluß. Krampfauslösend wirken das n-Propyl-, n-Butyl- und Cyclohexyl-Derivat.

Im Gegensatz zu den in 4-Stellung monosubstituierten 1-Phenyl-3,5 dioxo-pyrazolidinen besitzen mehrere 1,2-Diphenyl-3,5-dioxo-pyrazolidin-Abkömmlinge sowohl auf das Eiweiß- (-n-Butyl > -Phenyl > -Benzyl) als auch auf das Formalinödem (-n-Butyl > -Phenyl > -Benzyl > -Allyl) einen deutlichen protektiven Einfluß. Das Hyaluronidaseödem wird allein durch die Butyl-Verbindung sicher gehemmt.

Die akute Toxicität der Verbindungen dieser Reihe erfährt in Kombination mit I meistens eine Abnahme und mit II teilweise eine relative Steigerung. Während nach Zugabe von I alle geprüften Pyrazolidin-Derivate Erregungserscheinungen oder Krämpfe auslösen, wirkt zusammen mit II keines der geprüften Produkte mehr erregend. Der antipyretische Effekt von 35 mg/kg II (30%) tritt in Verbindung mit der analogen Menge des n-Butyl-Derivates (50%) bzw. der Cyclohexyl-Verbindung (40%) eindeutig verstärkt hervor.

Die guten ödemhemmenden Eigenschaften des n-Butyl-Derivates gleichen zusammen mit I bzw. II weitgehend denjenigen analoger Mengen beider Pyrazolone. Der protektive Einfluß der übrigen Pyrazolidine tritt in Kombination mit den Pyrazolonen zwar teilweise stärker hervor, ohne jedoch deren Wirkung zu erreichen.

Tabelle 4. *4-monosubstituierte 1,2-Diphenyl-3,5-dioxo-pyrazolidine*

I = 1-Phenyl-2,3-dimethyl-4-dimethylamino-pyrazolon; II = 1-Phenyl-2,3-dimethyl-4-isopropylamino-pyrazolon

— R	Maus		Kaninchen	Ratte								
				Eiweißödem			Formalinödem			Hyaluronidaseödem		
	DL 50 mg/kg i.v.	Erregung = E Krampf = K	Fieberhemmnug %	Gruppen zu 6 Tieren	Protekt. Einfluß %	P	Tiere	Protekt. Einfluß %	P	Tiere	Protekt. Einfluß %	P
-n-propyl	190	K	12	2	17	$< 0{,}01$	12	11	$< 0{,}01$	—	—	—
,, +I	—	—	—	2	18	$< 0{,}05$	12	19	$< 0{,}01$	—	—	—
,, +II	—	—	—	2	26	$< 0{,}001$	12	27	$< 0{,}01$	—	—	—
-n-butyl	110	K	95	5	30	$< 0{,}001$	18	42	$< 0{,}001$	18	62	$< 0{,}001$
,, +I	170	K	121	6	34	$< 0{,}001$	18	34	$< 0{,}01$	18	52	$< 0{,}01$
,, +II	180	0	119	6	33	$< 0{,}001$	18	46	$< 0{,}001$	18	56	$< 0{,}001$
-allyl	220	E	7	2	16	$< 0{,}01$	12	25	$< 0{,}001$	12	5	$> 0{,}05$
,, +I	210	E	65	2	26	$< 0{,}001$	12	29	$< 0{,}01$	12	35	$< 0{,}01$
,, +II	360	0	27	2	28	$< 0{,}001$	12	33	$< 0{,}001$	12	25	$< 0{,}02$
-cyclohexyl	160	K	86	2	11	$< 0{,}02$	12	8	$> 0{,}2$	—	—	—
,, +I	—	—	104	2	22	$< 0{,}001$	12	15	$< 0{,}02$	—	—	—
,, +II	—	—	108	2	26	$< 0{,}001$	12	26	$< 0{,}01$	—	—	—
-phenyl	140	0	37	3	27	$< 0{,}001$	12	34	$< 0{,}001$	12	18	> 0.1
,, +I	160	E	95	2	24	$< 0{,}01$	12	32	$< 0{,}001$	12	14	$> 0{,}1$
,, +II	310	0	65	2	31	$< 0{,}001$	18	21	$< 0{,}001$	12	37	$< 0{,}001$
-benzyl	105	E	22	2	20	$< 0{,}02$	12	31	$< 0{,}001$	12	20	$> 0{,}05$
,, +I	180	K	—	2	19	$< 0{,}01$	12	31	$< 0{,}01$	12	26	$< 0{,}05$
,, +II	200	0	—	2	20	$< 0{,}01$	12	31	$< 0{,}001$	12	33	$< 0{,}01$

Tabelle 5. *4-monosubstituierte 1, 2-Diphenyl-3-oxo-5-thion-pyrazolidine*

I = 1-Phenyl-2, 3-dimethyl-4-dimethylamino-pyrazolon; II = 1-Phenyl-2, 3-dimethyl-4-isopropylamino-pyrazolon

— R	Maus		Kaninchen	Ratte					
				Eiweißödem			Formalinödem		
	DL 50 mg/kg i.v.	Erregung = E Krampf = K	Fieberhemmung %	Gruppen zu 6 Tieren	Protekt. Einfluß %	P	Tiere	Protekt. Einfluß %	P
-n-propyl	460	E	0	2	15	$< 0{,}05$	12	30	$< 0{,}02$
„ +I	—	—	—	2	16	$< < 0{,}02$	12	29	$< < 0{,}05$
„ +II	—	—	—	2	18	$< < 0{,}05$	12	37	$< < 0{,}01$
-n-butyl	210	E	95	4	15	$< 0{,}02$	12	37	$< 0{,}01$
„ +I	—	—	80	2	18	$< < 0{,}05$	12	28	$< < 0{,}05$
„ +II	—	—	55	3	34	$< < 0{,}001$	12	42	$< < 0{,}01$
-phenyl	320	E	15	2	3	$> 0{,}7$	12	34	$< 0{,}02$
„ +I	—	—	90	2	9	$> > 0{,}2$	12	47	$< < 0{,}01$
„ +II	—	—	60	2	26	$< < 0{,}01$	12	40	$< < 0{,}01$

C. 1,2-Diphenyl-3-oxo-5-thion-pyrazolidine

Diese (Tab. 5) reihen sich hinsichtlich ihrer akuten Toxicität an der Maus zwischen die 1-Phenyl- und 1,2-Diphenyl-3,5-dioxo-Verbindungen ein. Die drei geprüften Substanzen wirken an der Maus erregend. Einen nennenswerten antipyretischen Einfluß besitzt allein das n-Butyl-Derivat. Gegenüber dem Eiweißödem sind die drei Produkte schwach, am Formalinödem hingegen gut wirksam.

In Verbindung mit II wirkt das allein schwach fieberhemmende Phenyl-Derivat deutlich antipyretisch. Auf das Eiweißödem besitzt lediglich die n-Butyl-Verbindung in Kombination mit II einen guten protektiven Einfluß; das Formalinödem wird durch alle drei Substanzen in Kombination mit I und II deutlich gehemmt.

Zusammenfassung

In 4-Stellung monosubstituierte 1-Phenyl-3,5-dioxo-, 1,2-Diphenyl-3,5-dioxo- und 1,2-Diphenyl-3-oxo-5-thion-Pyrazolidine (A, B und C) wurden allein und in Kombination mit Aminophenazon (I) bzw. Isopyrin (II) auf ihre akute Toxicität, zentral-erregen-

den Eigenschaften (Maus), antipyretische Wirkung (Kaninchen) und ihren Einfluß auf das Eiweiß-, Formalin- und Hyaluronidaseödem der Rattenhinterpfote geprüft. — Es wird eine Methode beschrieben, mit welcher sich der Einfluß von Pharmaka auf das Eiweißödem der Rattenhinterpfote unter übersehbaren Bedingungen reproduzieren läßt.

Die Verbindungen der Gruppe B sind giftiger und stärker zentral erregend als die entsprechenden der Gruppe A und C.

Erst die Substitution beider Stickstoffatome mit Phenyl-Gruppen ergibt Verbindungen, die neben ödemhemmenden auch gute antipyretische Eigenschaften aufweisen.

Innerhalb aller 3 Gruppen stellt jeweils das n-Butyl-Derivat das wirksamste Produkt dar.

I verstärkt die krampfauslösenden Eigenschaften der Pyrazolidine, II, welches ausgeprägte narkotische und antikonvulsive Eigenschaften besitzt, hebt sie auf. Während der antipyretische Einfluß der Pyrazolidine in Kombination mit I im wesentlichen auf dessen Eigenwirkung zurückzuführen ist, tritt in Verbindung mit II der fieberwidrige Einfluß einiger Pyrazolidine verstärkt hervor. — Die ödemmindernden Eigenschaften der Pyrazolidine sind in Kombination mit II im allgemeinen stärker ausgeprägt als in Kombination mit I.

Ein Zusammenhang zwischen der antipyretischen Wirkung der Pyrazolidine und ihren zentralerregenden oder ödemmindernden Eigenschaften ist — auch in Kombination mit I bzw. II — nicht erkennbar.

Fräulein Anneliese Heidt und Fräulein Gerda Lange danke ich für die bei der Durchführung der Versuche geleistete wertvolle Hilfe.

Literatur

Bickhardt, R., u. H.-J. Heite: Naunyn-Schmiedeberg's Arch. exp. Path. Pharmak. **221**, 393 (1954).
Bludau, W., u. H.-J. Heite: Arzneimittel-Forsch. **4**, 639 (1954).
Brodie, B. B., T. F. Yü, J. J. Burns, Th. Chenkin, B. C. Paton, J. M. Steele and A. B. Gutman: Proc. Soc. exp. Biol. (N. Y.) **283**, 884, (1954).
Büchi, J., J. Ammann, R. Lieberherr u. E. Eichenberger: Helv. chim. Acta **36**, 75 (1953).
Dox, A. W.: J. Amer. Chem. Soc. **54**, 3674 (1932).
Gross, F.: Naunyn-Schmiedeberg's Arch. exp. Path. Pharmak. **211**, 421 (1950).
Haas, H., u. H. Kraft: Arneimittel-Forsch. **4**, 249 (1954).
Küchle, H. J., u. H. Wegener: Z. ges. exper. Med. **118**, 136 (1952).
Roser, G.: Chem. Ber. **31**, 3011 (1898).
Ruhkopf, H.: Chem. Ber. **73**, 820 (1940).
Westphal, O., O. Lüderitz u. F. Bister: Z. Naturforsch. **7b**, 148 (1952).
Wilhelmi, G.: Schweiz. med. Wschr. **1949**, 577.
Wilhelmi, G., u. R. Domenjoz: Arch. internat. Pharmacodynamie **85**, 129 (1951).

Dr. Wolfgang Schoetensack,
Konstanz, Byk-Gulden Lomberg GmbH, Pharmakologisches Labor

Arch. exper. Path. u. Pharmakol., Bd. 233, S. 376—383 (1958)

Aus dem Pharmakologischen Institut der Universität Greifswald

Über die Giftwirkung von Monomethyl- und Dimethylthioacetamid

Von
K. Femmer

(Eingegangen am 12. Dezember 1957)

Die Zahl der Substanzen, welche eine Nekrose und fettige Infiltration der Leber verursachen, ist groß. Wie Ambrose, DeEds u. Rather feststellten, gehört auch das *Thioacetamid* zu den leberschädigenden Giften. Nach akuten Vergiftungen mit der letalen Dosis 200 mg/kg bei Ratten fanden die Autoren zentrallobuläre Nekrosen und periphere Fettinfiltrationen. Chronische Vergiftungen verursachten histologische Veränderungen, die dem Bild einer Lebercirrhose mit Hyperplasie der Gallenkanälchen entsprechen. Gupta konnte bei chronischer Verfütterung von Thioacetamid an Ratten außer Cholangiofibrosen in einem hohen Prozentsatz auch Gallengangscarcinome nachweisen, so daß Thioacetamid auch als stark wirksames Carcinogen angesehen werden muß. 1942 stellte Wels (in unveröffentlichten Untersuchungen) fest, daß Monomethylthioacetamid (MTA) und verschiedene Thioharnstoffderivate, beim Meerschweinchen percutan verabreicht, in kurzer Zeit zu einer schweren Leberverfettung führen. Durch diese Beobachtung angeregt, führte ich weitere Untersuchungen über die Giftigkeit des Monomethylthioacetamids durch und bezog das Dimethylthioacetamid (DTA) mit in die Untersuchungen ein.

Methodik

Als Versuchstiere dienten Mäuse, die weiße Laboratoriumsmaus und eine Kreuzung der grauen und der weißen Maus. Unterschiedliche Ergebnisse zwischen den beiden Mäusestämmen konnten nicht festgestellt werden. Die Tiere erhielten eine normale Kost, bestehend aus Hafer, Weizen, Hirse, Brot, Fleischmehl, Grünfutter und Milch. MTA und DTA[1] wurden intraperitoneal in physiologischer Kochsalzlösung injiziert. Für die Versuche wurden Tiere von 18—23 g Gewicht verwendet. Die Bestimmung der LD_{50} erfolgte nach Behrens.

Fettbestimmung der Leber. Die Tiere wurden durch Dekapitation getötet, die Leber in toto herauspräpariert, in physiologischer Kochsalzlösung abgespült und gewogen. Anschließend wurde die Leber bei 105° C getrocknet. Aus dem Gewichtsverlust wurde der Wassergehalt in Prozenten errechnet. Durch 24stündige Extraktion im Mikrosoxhlet mit Äther wurde der Fettgehalt ermittelt.

Blutzuckerbestimmung nach Frank und Kirberger und nach Hagedorn-Jensen.

[1] Herrn Prof. Wirth, Elberfeld, danken wir für die freundliche Überlasssung der Präparate.

Glykogenbestimmung nach WALAAS u. WALAAS. Die gesamte Leber wurde in 30%iger KOH 30 min im kochenden Wasserbad homogenisiert und nach der Vorschrift der genannten Autoren weiter verarbeitet. Glucosebestimmung nach FRANK u. KIRBERGER; der Glykogengehalt wurde in mg Glykogen je Milligramm N berechnet.

N-Bestimmung Mikro-Kjeldahl, Vorlage n/50 Schwefelsäure, Mischindicator Methylrot—Methylblau. 0,1 cm³ des Homogenisates wurden verascht und der Gesamt-Stickstoffgehalt nach dem Volumen berechnet.

Gewebsatmung. Die Tiere wurden durch *Querschnitt* getötet, die Leber bzw. das Zwerchfell in eisgekühlter physiologischer Kochsalzlösung abgespült. Die Leberschnitte wurden mit einem Rasiermesser angefertigt und in eisgekühlter Suspensionslösung aufgefangen. Suspensionslösung nach FRUNDER NaCl 0,108 m, KCl 0,012 m, $CaCl_2$ 0,006 m, $MgCl_2$ 0,005 m, Na-Phosphatpuffer 0,03 m p_H 7,4, als Substrat Glucose 0,02 m bzw. Succinat 0,01 m. Im Gasraum Sauerstoff. Jedes Barcroft-Gefäß (kegelförmig, etwa 15 cm³ Inhalt) wurde mit zwei, bisweilen auch drei Schnitten beschickt. Die Zeit vom Töten des Tieres bis zum Einsetzen der Manometer in den Thermostaten betrug 10 min. Temperaturausgleich 10 min. Der Q_{O_2}-Wert wurde nach der Vierzigminuten-Ablesung berechnet.

Versuchsergebnisse

I. Tödliche Dosen von MTA und DTA und pathologisch-anatomische Befunde

Die Tab. 1 zeigt die Verhältnisse:

Tabelle 1. *Eintritt des Todes in Stunden nach verschiedenen Mengen MTA bei i.p. Injektion in Mäuse von 18—23 g Gewicht. Die LD_{50} lag bei 0,08 mg/g Maus*

Dosis in mg/g Maus	0,7—0,5	0,2	0,1	0,08 (LD_{50})
Eintritt des Todes in Stunden nach i.p. Injektion	16—24	24—36	36—42	48—96

Bei einer Dosierung über 0,1 mg/g Maus ergab die Sektion der Tiere stark ausgeprägte Pleuraergüsse, Ascites, starke Hyperämie der Lunge und der Leber. Histologisch[1] zeigten sich in der Lunge allgemeine Hyperämie, geringes herdförmiges Ödem, mehrere kleine herdförmige intraalveoläre Blutungen. In der Leber allgemeine Hyperämie, zentroazinäre, feintropfige Verfettung mittleren Grades, geringe vacuoläre Umwandlung von Leberzellen, meist in der Läppchenperipherie, gelegentlich Einzelnekrosen.

Bei einer Dosierung unter 0,1 mg/g Maus waren nur geringe Exsudate vorhanden. Manchmal fehlten sie vollständig. Der Tod erfolgte erst nach 48—96 Std. Dagegen war bei dieser Dosierung der Leberschaden besonders stark ausgebildet. Die histologischen Befunde waren die folgenden: In der Lunge allgemeine Hyperämie, herdförmige teils subpleural, teils peribronchial liegende Atelektasen. In der Leber ausgedehnte konfluierende Massennekrosen, stellenweise schmal histio-lymphocytär demarkiert, dem Bild einer akuten Leberdystrophie vergleichbar.

[1] Für die Durchführung dieser Untersuchungen danke ich Herrn Prof. HOLLE und Herrn Oberarzt Dr. WERNER vom hiesigen Pathologischen Institut.

Erhaltenes Parenchym sehr hyperämisch, Leberzellen in hohem Grade und allgemeiner Ausdehnung klein- bis mitteltropfig verfettet, manchmal auch vacuolig umgewandelt und atrophisch.

Bei der Tötung der Tiere 16 Std nach 0,1 mg MTA/g Maus fand sich histologisch in der Leber eine allgemeine Hyperämie, feintropfige Verfettung, vacuolige Umwandlung der Leberzellen und mehrere kleine dichte periportale histio-lymphocytäre Infiltrate.

Die LD_{50} von Dimethylthioacetamid war etwa 0,5 mg/g Maus. Der Tod tritt bei dieser Dosierung nach etwa 17 Std ein. Makroskopisch findet sich dann eine sehr starke Hyperämie aller Organe, besonders der Lunge und der Leber. Pleuraergüsse und Ascites fehlen. Bei einer Dosierung von 0,1 mg/g Maus (das ist die gleiche Dosierung wie beim Monomethylthioacetamid) findet sich nach 16 Std histologisch ein pathologischer Leberbefund, welcher dem nach MTA weitgehend gleicht, aber nicht in eine akute Leberdystrophie übergeht.

II. Leberverfettung nach MTA und DTA

Um das Ausmaß der Leberverfettung festzustellen, wurde zunächst das Leberfeuchtgewicht (Frischgewicht), Trockengewicht, Wassergehalt und der Fettgehalt mit den Normalwerten verglichen. Die Normalwerte stimmen mit den Werten in der Literatur (Frunder u. Friedel) überein. Die Ergebnisse zeigt die Tab. 2.
Aus der Tab. 2 ergibt sich:

Tabelle 2. *Leberzusammensetzung von 18—23 g schweren Mäusen 16 Std nach i.p. Injektion von 0,1 mg/g MTA und DTA. Mittel aus je 10 Bestimmungen*
Die Zahlen in den Klammern geben die mittlere Abweichung (σ) wieder

	normal	16 Std nach i.p. Injektion von	
		0,1 mg/g MTA	0,1 mg/g DTA
Feuchtgewicht	0,933 g (± 0,21)	1,142 g (± 0,24)	1,007 g (± 0,23)
Trockengewicht	0,271 g (± 0,034)	0,358 g (± 0,09)	0,350 g (± 0,06)
Wassergehalt	0,663 g (± 0,08)	0,784 g (± 0,18)	0,663 g (± 0,17)
Prozent Wasser	71,1% (± 0,1)	68,5% (± 0,9)	64,7% (± 5,3)
Ätherlösliche Bestandteile . . .	39,1 mg (±12,6)	121 mg (±29,7)	126 mg (±43,6)
Ätherlösliche Bestandteile in Prozent bez. auf das Feuchtgewicht . .	4,0% (± 1,9)	10,7% (± 1,9)	14,3% (± 6,9)
Durchschnittliches Gewicht der Tiere	19,9 g (± 1,8)	19,0 g (± 1,3)	19,5 g (± 1,8)

MTA und DTA führen innerhalb von 16 Std zu einer deutlichen Leberverfettung. Die Fetteinlagerung führt zu einer Gewichtszunahme des Feucht- und Trockengewichts. Bei den mit MTA vergifteten Tieren kommt es darüber hinaus zu einer Zunahme des Wassergehaltes, vermutlich infolge einer Capillarschädigung, welche zum Plasmaaustritt führt.

Vereinzelt finden sich bereits nach 16 Std bei MTA stärkere Hämorrhagien. Bei solchen hämorrhagischen Lebern ist die Fetteinlagerung geringer, dagegen ist der Wassergehalt dann besonders hoch.

III. Blutzucker und Leberglykogen nach MTA

Wie die Tab. 3 zeigt, sind die Blutzuckerwerte nach Hagedorn-Jensen bei den vergifteten Tieren gering erhöht, die Blutzuckerwerte nach Frank-Kirberger dagegen normal. Die Erhöhung der Hagedorn-Jensen-Werte ist wahrscheinlich auf die Anwesenheit des Giftes selbst

Tabelle 3. *Blutzucker und Leberglykogen von Mäusen 3 Std nach i.p. Injektion von 0,25 mg/g MTA. Mittel aus 10 Bestimmungen*
Das Leberglykogen ist in mg Glykogen/mg Leberstickstoff angegeben. Die Zahlen in den Klammern geben die mittlere Abweichung (σ) wieder

	Hagedorn-Jensen	Frank-Kirberger	Differenz	Leberglykogen
normal	126 mg-% (± 17)	96 mg-% (± 15)	34 mg-% (± 8)	0,60 mg/mg N (± 0,3)
0,25 mg/g 3 Std	152 mg-% (± 29)	89 mg-% (± 19)	64 mg-% (± 12)	0,13 mg-% (± 0,1)

zurückzuführen, das reduzierend wirkt und daher bei der Blutzuckerbestimmung nach Hagedorn-Jensen mit erfaßt wird. Dagegen wird bei der Blutzuckerbestimmung nach Frank-Kirberger allein die Glucose bestimmt.

IV. Gewebsatmung nach MTA

Die Tab. 4 zeigt, daß die Atmung des Zwerchfells nach Vergiftung der Tiere nicht beeinflußt wird. Die Atmung der Leber mit Glucose als Substrat nimmt um etwa 60% ab, dagegen bleibt die Leberatmung mit Succinat als Substrat annähernd auf dem normalen Wert. Die Succinat-Atmung in der geschädigten Leber ist als auffallend groß anzusehen, wenn man berücksichtigt, daß die Atmung der normalen Leber durch das Substrat Succinat anstelle von Glucose von 14,0 auf 28,1 ansteigt, die der geschädigten Leber dagegen von 5,5 auf 29,5, was einen Anstiegswert von 24,0 gegenüber nur 14,1 der normalen Leber ergibt.

Die Q_{O_2}-Werte sind auf mg Trockengewicht bezogen. Frunder u. Friedel weisen darauf hin, daß das Trockengewicht für solche Fälle

Tabelle 4. *Q_{O_2}-Werte bei der Atmung von Leberschnitten und Zwerchfell bei Mäusen 16 Std nach i.p Injektion von 0,1 mg/g Maus. Mittel aus je 10 Bestimmungen* Die Zahlen in den Klammern geben die mittlere Abweichung (σ) wieder

	normal	0,1 mg/g nach 16 Std
Leber: Glucose 0,022 m als Substrat	14,0 (±1,1)	5,5 (±2,9)
Succinat 0,01 m als Substrat	28,1 (±2,9)	29,5 (±2,9)
Zwerchfell: Glucose 0,022 m als Substrat	23,3 (±0,4)	23,3 (±2,6)

eine schlechte Bezugsgröße ist, denn durch die Fetteinlagerung vermehrt sich die Lebersubstanz um Beträge, welche nicht an der Atmung beteiligt sind. Eine bessere Bezugsgröße ist der Stickstoffgehalt der Leber, vorausgesetzt, daß er nicht durch die Vergiftung verändert wird. Letzteres wurde überprüft. Die Tab. 5 zeigt, daß die MTA Vergiftung auf den Stickstoffgehalt keinen Einfluß hat.

Tabelle 5. *Gesamt-Stickstoffgehalt von normalen und vergifteten Tieren 0,1 mg/g. Der Prozent N-Gehalt bezogen auf das Trockengewicht wurde aus dem ermittelten Trockengewicht berechnet. Dieser nimmt um etwa 25% infolge der relativen Abnahme des Lebereiweißes ab*

	normal	0,1 mg/g nach 16 Std
Gesamt-N in mg	28,6	28,8
N-Prozent bez. auf das Trockengewicht	10,5 %	7,7 %
Durchschnittl. Gewicht der Tiere	19,5 g	20,2 g

Die Umrechnung der Q_{O_2}-Werte erfolgt nach Frunder u. Friedel durch Multiplikation der Q_{O_2}-Werte mit dem durchschnittlichen Stickstoffquotienten (N-Prozent normal/N-Prozent verfettet = 1,36). Als korrigierte Werte erhält man:

Glucose:	14,1 normal	7,5 verfettet
Succinat:	28,1 normal	40,0 verfettet

Nach dieser Korrektur ist die Abnahme der Atmung mit Glucose nur etwa 50% (unkorrigiert 60%). Mit Succinat als Substrat nimmt dagegen die Atmung nicht ab, sondern um etwa 40% zu.

Weiterhin wurde untersucht, ob die Atmung von Leber und Zwerchfell in vitro durch MTA beeinflußt wird. Es konnte selbst in einer Konzentration von $2{,}5 \cdot 10^{-2}$ am Zwerchfell und an der Leber keine Veränderung der Atmung festgestellt werden.

Besprechung der Versuchsergebnisse

Vergiftungen mit Monomethylthioacetamid führen zum Auftreten von Lungenödem, Pleuraerguß und Ascites. Darüber hinaus kommt es zu einer Parenchymschädigung der Leber. Bei einer Dosierung von 0,1 mg/g sind die Exsudate nach 36—42 Std so stark ausgebildet, daß der Tod mit großer Wahrscheinlichkeit hierauf zurückgeführt werden kann. Bei geringerer Dosierung sterben die Tiere erst nach 48—96 Std. Zu diesem Zeitpunkt sind nur noch geringe Exsudate nachzuweisen, dagegen findet sich eine schwere Leberdystrophie. Man kann daher vermuten, daß bei dieser geringeren Dosierung nicht die Exsudate die Todesursache darstellen, sondern die Tiere an dem erst später voll ausgebildeten Leberschaden sterben. Die LD_{50} liegt bei 0,08 mg/g Maus.

Pleuraerguß und Lungenödem mit entzündlichen Infiltrationen des Interstitiums sind schon länger bekannte charakteristische Symptome der Vergiftungen mit Thioharnstoffderivaten (Richter). Ferner konnten Dieke, Allen u. Richter bei der Durchprüfung einer großen Anzahl von Thioharnstoffderivaten und ähnlich gebauten Verbindungen feststellen, daß vor allem die aromatisch substituierten Thioharnstoffderivate und einige Thioamidverbindungen diese Capillarschädigung in ausgeprägter Form hervorrufen. Nach den hier vorgelegten Ergebnissen muß auch Monomethylthioacetamid in diese Gruppe eingereiht werden.

Dimethylthioacetamid erwies sich in unseren Versuchen als weniger giftig. Die LD_{50} liegt bei etwa 0,5 mg/g Maus. Die allgemeine sehr stark ausgebildete Hyperämie läßt vermuten, daß auch hier trotz Fehlens makroskopischer Exsudate eine Schädigung der Capillaren vorliegen könnte, jedoch muß durch weitere Untersuchungen festgestellt werden, ob hierauf der Tod zurückzuführen ist. Obgleich DTA in gleicher Dosierung wie MTA (0,1 mg/g Maus) innerhalb von 16 Std zu einer Parenchymschädigung der Leber führt, welche histologisch dem Leberschaden nach MTA weitgehend gleicht, konnte bei DTA niemals der Übergang in eine letale Leberdystrophie festgestellt werden.

Die Hyperglykämie, wie sie von DuBois u. Mitarb. bei Vergiftungen mit aromatischen Thioharnstoffderivaten beschrieben ist, fehlt. DuBois führt die Hyperglykämie auf eine Hemmung des Adrenalinabbaus zurück, denn Ergotamin und Nebennierenexstirpation verhindern die Hyperglykämie. Eine Adrenalinvermehrung im Blut konnten die Autoren jedoch nicht direkt feststellen. Da ferner der letale Ausgang der Vergiftung durch Ergotamin und Nebennierenexstirpation nicht verhindert

wird, ist es nicht wahrscheinlich, daß die Veränderungen im Kohlenhydratstoffwechsel die Ursache der toxischen Wirkung der Thioharnstoffderivate sind, obwohl bei diesen Stoffen zwischen Giftigkeit und der zur Hyperglykämie erforderlichen Dosis eine deutliche Korrelation besteht. Auch die fehlende Hyperglykämie nach tödlichen Vergiftungen mit MTA ist ein Beweis dafür, daß ein solcher unmittelbarer ursächlicher Zusammenhang nicht besteht.

Der schnelle Glykogenabbau in der Leber ist als Zeichen einer allgemeinen Leberschädigung zu werten. Wie Frunder, Fischer u. Börnig zeigten, führen selbst leichte Schädigungen zu einem sehr schnellen aber bald vorübergehenden Glykogenabbau in der Leber. Gleiche Befunde sind auch von O. Wieland u. Mitarb. bei Amanitinvergiftungen an Mäusen erhoben worden.

Der O_2-Verbrauch experimentell geschädigter Lebern ist sehr oft untersucht worden (Califano, Benda, Locker u. Rissel; Christie u. Judah; Heim, Leuschner u. Ott; Frunder u. Friedel). Teilweise fanden die Autoren Atmungssteigerungen, zum Teil aber auch eine Abnahme des O_2-Verbrauches. Die unterschiedlichen Ergebnisse sind sicher von der Art der Schädigung und von der Schwere der Schädigung abhängig. Die starke Abnahme der Atmung in meinen Versuchen ist verständlich, wenn man die starke morphologische Schädigung des Lebergewebes berücksichtigt. Die Verfettung und trübe Schwellung der Leber, die in meinen Versuchen in ausgesprochenem Maße vorhanden war, geht nach Dianzani (1, 2) mit einer Schwellung der Mitochondrien einher. Wie Raaflaub und Dianzani (2) bewiesen, nimmt mit zunehmender Schwellung der Mitochondrien die Fähigkeit, Substrate des Krebscyclus zu oxydieren, ab. Eine Sonderstellung nimmt Succinat ein. Dieses wird von geschwollenen Mitochondrien stärker oxydiert. Hierdurch läßt sich vermutlich die Zunahme der Succinatatmung der geschädigten Leber in meinen Versuchen erklären.

In vitro konnte keine Hemmung der Gewebsatmung durch MTA und DTA festgestellt werden. Es ist deshalb unwahrscheinlich, daß die Ursache der Schädigung primär auf einer Hemmung der energieliefernden Reaktionen beruht, jedoch muß man hierbei berücksichtigen, daß die Atmung der Schnitte in Salzsuspensionslösungen durchgeführt wurde. Warburg, Gawehn u. Geissler haben neuerdings bewiesen, daß die Atmung der Gewebsschnitte in Salzsuspensionslösungen geschädigt ist. Es ist deshalb möglich, daß beim Arbeiten in einem solchen jetzt als unphysiologisch erkannten Milieu eine Hemmung der Atmung durch den untersuchten Stoff übersehen wird, weil dieser auf eine bereits geschädigte Atmung einwirkt. Um diesen neuerdings aufgetauchten Einwand auszuschalten, müßten die Versuche in Serum wiederholt werden, in dem Warburg jetzt seine Atmungsversuche nur noch ausführt.

Zusammenfassung

1. Vergiftungen mit Monomethylthioacetamid (MTA) 0,1 mg/g führen bei der Maus innerhalb von 24—36 Std zu einer tödlichen Capillarschädigung mit Lungenödem, Pleuraerguß und Ascites, wie es für Thioharnstoffderivate charakteristisch ist. Bei einer Dosierung unter 0,1 mg/g fehlen diese charakteristischen Symptome der Thioharnstoffvergiftung oder sind nur gering ausgebildet. Der Tod erfolgt erst nach 48—96 Std durch eine akute Leberdystrophie. — Die LD_{50} beträgt 0,08 mg/g Maus.

2. Dimethylthioacetamid (DTA) ist weniger giftig. Die LD_{50} beträgt hier etwa 0,5 mg/g. Der Tod erfolgt nach etwa 17 Std. Pleuraerguß und Ascites fehlen. Es kommt auch bei Herabsetzung der Dosis und der damit bedingten längeren Lebensdauer nicht zur Ausbildung einer Leberdystrophie.

3. Eine Hyperglykämie, wie sie für die aromatischen Thioharnstoffderivate beschrieben ist, fehlt.

4. Die Atmung von Leberschnitten aus den durch MTA geschädigten Tieren ist bei Glucose als Atmungssubstrat um 50% gehemmt, bei Succinat als Atmungssubstrat jedoch um etwa 40% gesteigert. Die Beziehungen dieses Befundes zu der einschlägigen Literatur werden besprochen. In vitro hat MTA keinen Einfluß auf die Gewebsatmung.

Literatur

Ambrose, A. M., F. DeEds and L. J. Rather: J. industr. Hyg. **31**, 158 (1949). — Proc. Soc. exp. Biol. (N. Y.) **74**, 132 (1950).

Benda, L., A. Locker u. E. Rissel: Z. ges. exp. Med. **126**, 537 (1956).

Du Bois, K. P., L. W. Holm and W. L. Doyle: J. Pharmacol. exp. Ther. **87**, 53 (1947).

Du Bois, K. P., R. G. Herrmann and W. F. Erwan: J. Pharmacol. exp. Ther. **89**, 186 (1947).

Califano, L.: Biochem. Z. **289**, 354 (1937).

Christie, G. S., and J. D. Judah: Proc. roy. Soc. B **142**, 241 (1954).

Dianzani, M. U.: (1) Biochim. biophys. Acta **11**, 353, 67 (1953); (2) **14**, 514 (1954).

Dieke, S. H., G. S. Allen and C. P. Richter: J. Pharmacol. exp. Ther. **90**, 260 (1947).

Frank, H., u. E. Kirberger: Biochem. Z. **320**, 359 (1949/50).

Frunder, H.: Hoppe-Seylers Z. physiol. Chem. **291**, 182 (1952).

Frunder, H., u. W. Friedel: Hoppe-Seylers Z. physiol. Chem. **295**, 77 (1953).

Frunder, H., W. Fischer u. H. Börnig: Hoppe-Seylers Z. physiol. Chem. **306**, 112 (1956).

Gupta, D. N.: Nature (Lond.) **175**, 257 (1955).

Heim, F., F. Leuschner u. A. Ott: Naunyn-Schmiedeberg's Arch. exper. Path. Pharmak. **229**, 360 (1956).

Raaflaub, J., Helv. physiol. pharmacol. Acta **11**, 157 (1953).

Richter, C. P.: J. Amer. med. Ass. **129**, 927 (1945). — J. thorac. Surg. **23/1**, 66/91 (1952), zit. nach Excerpta med. (Amst.) Sect. II **7** No. 545 (1954).

Walaas, O., and E. Walaas: J. biol. Chem. **187**, 769 (1950).

Warburg, O., K. Gawehn u. A. W. Geissler: Z. Naturforsch. **12b**, 115 (1957).

Wieland, O., H. E. Fischer u. M. Reiter: Naunyn-Schmiedeberg's Arch. exp. Path. Pharmak. **215**, 75 (1952).

Dr. K. Femmer, Radebeul I/Dresden Augustusweg 57

Arch. exper. Path. u. Pharmakol., Bd. 233, S. 384—392 (1958)

Aus der Abteilung für experimentelle Medizin der F. Hoffmann-La Roche & Co. AG., Basel

Experimentelle Beiträge zur Pathophysiologie des Klärfaktors

Von
K. Reber und A. Studer

Mit 3 Textabbildungen

(Eingegangen am 22. November 1957)

Der Postheparin-Klärfaktor hat seit seiner Entdeckung durch Hahn[5] infolge seiner vermuteten Bedeutung für die Pathogenese der Arteriosklerose eine eingehende Bearbeitung erfahren. Trotzdem sind unsere Kenntnisse in bezug auf sein Verhalten bei pathologischen Zuständen und in verschiedenen physiologischen Situationen sehr spärlich.

In der Literatur wird über eine Verminderung der Klärfaktor-Aktivierbarkeit bei akutem Rheumatismus[7] und über erhöhte Aktivität in Fällen von chronischem Alkoholismus[2] berichtet. Diese Beobachtungen stehen jedoch vereinzelt da. Die folgenden Untersuchungen sollen einen experimentellen Beitrag zur Kenntnis des Verhaltens des Klärfaktors unter verschiedenen experimentellen Bedingungen darstellen. Sie umfassen Bestimmungen der Klärfaktor-Aktivierbarkeit und Spontanaktivität 1. nach experimenteller Leberschädigung, 2. bei trächtigen Versuchstieren, 3. nach Behandlung der Versuchstiere mit weiblichen Geschlechtshormonen und gonadotropem Hormon und 4. nach Alloxanschädigung.

I. Leberschädigung durch Tetrachlorkohlenstoff und Klärfaktoraktivität

Versuchsanordnung. *1. Erzeugung der Leberschädigung.* a) Bei etwa 2,5 kg schweren *Kaninchen* wurden zur Belastung des reticulo-endothelialen Systems entsprechend dem Vorgehen von Studer[11] 3 ml einer 1%igen Trypanblaulösung i.v. injiziert und unmittelbar nachher 0,5 ml Tetrachlorkohlenstoff, gelöst in 0,5 ml Arachisöl, mit der Magensonde verabreicht.

b) Bei *Ratten* wurde die Leberschädigung durch Verabreichung von 0,25 ml Tetrachlorkohlenstoff, gelöst in 0,75 ml Arachisöl, erzeugt. In einer Versuchsreihe, welche der Ermittlung der Klärfaktorwerte längere Zeit (bis 18 Tage) nach Setzen der Leberschädigung dienen sollte, wurde diese Dosis am 2. und 3. Versuchstag wiederholt. Für die Klärfaktorbestimmung in der Frühphase der Schädigung (bis zu 24 Std nach der Tetrachlorkohlenstoff-Verabreichung) wurde der Tetrachlorkohlenstoff intraperitoneal injiziert, im übrigen mit der Schlundsonde verabfolgt.

2. Bestimmung der Klärfaktoraktivität. Die Klärfaktoraktivität im Plasma der Versuchstiere wurde größtenteils 15 min nach i.v. Injektion (Kaninchen) bzw. 30 min nach intraperitonealer Injektion (Ratte) von 2 mg/kg Heparin untersucht.

In wenigen Fällen wurde die Dosis von 4 mg/kg Heparin verabreicht, und schließlich wurde die Klärfaktoraktivität ohne vorgängige Heparinverabreichung untersucht.

Das zu untersuchende Blut wurde durch Herzpunktion unter Zusatz von 10 Vol-% 3,6%iger Natriumcitratlösung gewonnen. Es wurde unmittelbar nach der Entnahme 5 min bei 2500 U/min zentrifugiert und das Plasma zu gleichen Teilen mit einer 0,5%igen Lösung einer Tween 60-stabilisierten Emulsion von 10 g-% Sesamöl gemischt. Unmittelbar nach Mischung und 30 min nach Inkubation der Mischung bei 37° C wurde die Transparenz mit dem Spektrophotometer „Spectronic 20" bei 660 mμ bestimmt. Das Resultat wird als Differenz der ersten und zweiten Ablesung angegeben.

Ergebnisse. (Vgl. Abb. 1, 2 und 3.) Die Normalwerte für Kaninchen und Ratten sind in Tab. 1 aufgeführt. Nach Verabreichung von Tetrachlorkohlenstoff kommt es sowohl bei Kaninchen wie bei Ratten zu einer vorübergehenden sehr starken Beeinträchtigung der Klärfaktor-Aktivierbarkeit, die 6—8 Std nach der Tetrachlorkohlenstoff-Verabreichung am ausgeprägtesten in Erscheinung tritt. Diese Beeinträchtigung macht im Laufe der folgenden Tage einer allmählichen Normalisierung Platz, und schließlich werden bei der Ratte sogar deutlich erhöhte Werte erreicht. Bei der Ratte verläuft die Kurve der spontanen Klärfaktoraktivität ungefähr parallel dazu. Die Werte sind fast durchwegs deutlich erhöht. Die Spontanaktivität beim Kaninchen weist keine Parallelität zu den nach Heparinaktivierung beobachteten Werten auf. Sie ist hinsichtlich der absoluten Werte nur anfänglich eindeutig vermehrt.

Tabelle 1. *Klärfaktoraktivität bei unbehandelten Kaninchen und Ratten, spontan und nach Heparinaktivierung, gemessen an der Zunahme der Lichtdurchlässigkeit des Substrats innerhalb 30 min*
(Differenz der Transparenz zum Zeitpunkt 0 und 30 min)

	Heparindosis mg/kg i.v.	Klärfaktoraktivität Mittelwert $\pm$ 2 m†
Kaninchen	0,0	0,08 $\pm$ 0,12
	2,0	21,0 $\pm$ 2,34
	Heparindosis mg/kg i.p.	
Ratten	0,0	0,9 $\pm$ 0,54
	2,0	26,75 $\pm$ 4,09
	4,0*	

† $m = \sqrt{\frac{S(x-x)^2}{(N-1)\cdot N}}$

* Die Klärfaktoraktivität nimmt bei Steigerung der Dosis über 2,0 mg/kg nicht weiter zu.

Diskussion. Die Unterschiede der spontanen Klärfaktoraktivität zwischen Ratten und Kaninchen sind offenbar auf artspezifische Faktoren zurückzuführen. Es ist bekannt, daß die Ratte neben der Lipoproteinlipase, die im allgemeinen mit dem Klärfaktor gleichgesetzt wird, eine beträchtliche Aliesteraseaktivität im Plasma entwickelt, während das Kaninchenplasma fast ausschließlich Lipoproteinlipase enthält[8]. Da die Aliesterase ausschließlich in der Leber gebildet wird, während für die Lipoproteinlipase wahrscheinlich andere Entstehungsorte in Frage

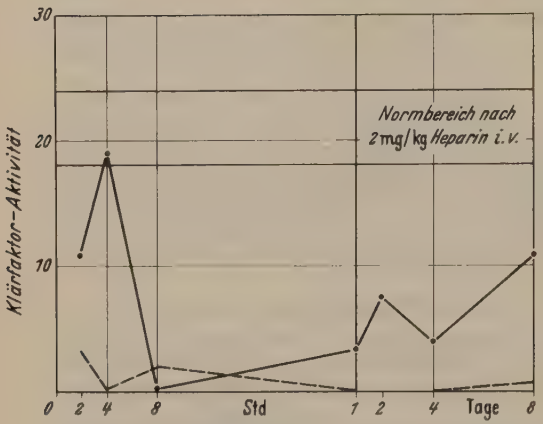


Abb. 1. Klärfaktoraktivität bei Kaninchen nach Behandlung mit 3 ml Trypanblau 1% ig i.v. + 0,5 ml CCl_4 in 0,5 ml Arachisöl peroral. Ordinate: Zunahme der Lichtdurchlässigkeit des Substrats innerhalb 30 min (Differenz der Transparenz zum Zeitpunkt 0 und 30 min). Abszisse: Zeit nach Verabreichung von Trypanblau und CCl_4. —— 15 min nach i.v. Injektion von 2 mg/kg Heparin: ———— spontane Klärfaktoraktivität. Jeder Kurvenpunkt stellt einen Mittelwert von 2 Versuchstieren dar

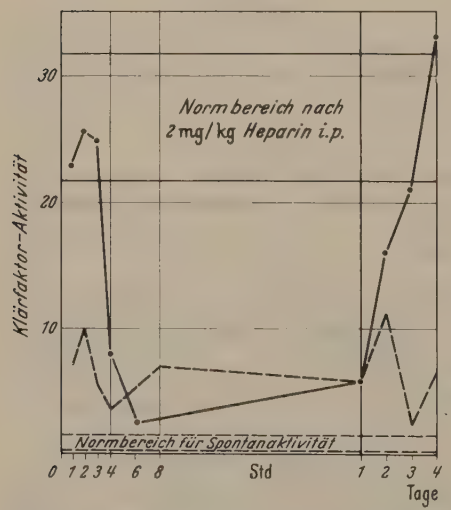


Abb. 2. Klärfaktoraktivität bei Ratten nach einmaliger Behandlung mit 0,25 ml CCl_4 in 0,75 ml Arachisöl intraperitoneal (Bestimmung 1—8 Std nach der Behandlung) oder peroral (Bestimmung 1—4 Tage nach der Behandlung). Ordinate: Wie Abb. 1. Abszisse: Zeit nach Verabreichung des CCl_4. —— 30 min nach intraperitonealer Injektion von 2 mg/kg Heparin; ———— spontane Klärfaktoraktivität. Jeder Kurvenpunkt stellt einen Mittelwert von 2—3 Versuchstieren dar

kommen, wäre eine Erklärung des unterschiedlichen Verhaltens der beiden untersuchten Tierarten möglicherweise in dieser Richtung zu suchen. Insbesondere ist die Möglichkeit in Berücksichtigung zu ziehen, daß die auffallend hohe Spontanaktivität in den ersten Stunden nach der Tetrachlorkohlenstoff-Verabreichung bei der Ratte auf eine Aliesterasefreisetzung aus der Leber zurückgeht.

Nach den von Anfinsen[1] u. a. ausgeführten Klärfaktor-Reinigungsversuchen mit Hilfe der Plasmafraktionierung muß angenommen werden, daß der Klärfaktor ein Eiweißkörper aus der Gruppe der Globuline ist. Diese werden zu einem großen Teil in der Leber synthetisiert. Möglicherweise wirkt sich eine Störung der Leberfunktion auf diesem Wege auf die Klärfaktoraktivität aus.

Der Vergleich unserer experimentellen Befunde mit den in der Literatur gemachten Angaben über erhöhte Klärfaktor-Aktivierbarkeit bei Fällen von chronischem Alkoholismus, bei denen wohl ein Leberschaden angenommen werden darf[2], ergibt gute Übereinstimmung mit den bei der Ratte erhobenen Befunden.

Unsere Resultate lassen es allerdings als möglich erscheinen, daß bei schwerer Beeinträchtigung der Leberfunktion bzw. in der akuten Phase einer Leberschädigung auch beim Menschen erniedrigte Werte gefunden werden könnten.

Andere Literaturangaben über Leberperfusionsexperimente, bei denen eine Klärfaktorinaktivierung nach der Perfusion durch die Leber gefunden wurde[6], lassen sich mit unseren Befunden schwer in Übereinstimmung bringen. Wir fragen uns, ob die in diesen Experimenten beobachtete Aktivitätseinbuße nicht vielmehr auf die bei Temperaturen um 37° C rasch vor sich gehende Inaktivierung des labilen Klärfaktors zurückzuführen ist.

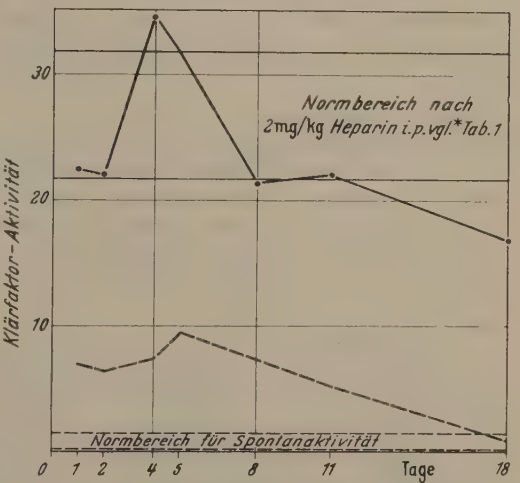


Abb. 3. Klärfaktoraktivität bei Ratten nach Behandlung mit 0,25 ml CCl_4 in 0,75 ml Arachisöl peroral am 1., 2. und 3. Versuchstag. Übrige Legende wie bei Abb. 2. Heparindosis 4 mg/kg

Der Vergleich unserer Befunde mit früher erhobenen[11], wonach nach Tetrachlorkohlenstoff-Schädigung beim Kaninchen eine vorübergehende „Heparinresistenz" hinsichtlich der Heparinwirkung auf die Blutgerinnung auftritt, ergibt weitgehende Parallelität: So ist beispielsweise der zeitliche Ablauf insofern identisch, als diese Heparinresistenz ebenfalls wenige Stunden nach der Tetrachlorkohlenstoff-Verabreichung am ausgesprochensten ist und nachher wieder zurückgeht. Diese Parallelität könnte die Vermutung nahelegen, daß nach der Tetrachlorkohlenstoff-Vergiftung zeitweise ein Heparinhemmkörper in Erscheinung tritt.

II. Klärfaktoraktivität und Gravidität

Die Untersuchung wurde durch die zufällige Beobachtung veranlaßt, daß sich bei einem trächtigen Kaninchen nach Heparininjektionen nur ganz ungewöhnlich niedrige Werte für die Klärfaktoraktivität nachweisen ließen.

Versuchsanordnung. Bei 6 trächtigen Ratten wurde die Klärfaktoraktivität nach Verabreichung von 2 mg/kg Heparin bestimmt und mit derjenigen von 6 normalen Kontrolltieren verglichen.

Dieselbe Untersuchung wurde bei 12 trächtigen Kaninchen ausgeführt. Bei diesen Versuchstieren waren wiederholte Messungen in Abständen von 2—4 Tagen möglich.

Technik der Klärfaktorbestimmung wie unter I.

Ergebnisse. Bei den untersuchten Versuchstieren findet sich eine nicht obligate Senkung der Klärfaktor-Aktivierbarkeit. Wie aus den bei Kaninchen wiederholt vorgenommenen Messungen hervorgeht, sind auch nur einzelne abnorm tiefe Werte möglich, während die wenige Tage vorher oder nachher bestimmte Aktivität praktisch normal ist. Wenige Tage vor dem Partus, spätestens kurz nach demselben, kommt es zu einer Normalisierung der Klärfaktor-Aktivierbarkeit (vgl. Tab. 2).

Tabelle 2. *Klärfaktoraktivität bei trächtigen Kaninchen und Ratten, 15 min (bzw. 30 min) nach i.v. (bzw. intraperitonealer) Injektion von 2 mg Heparin, angegeben als Zunahme der Lichtdurchlässigkeit des Substrats innerhalb 30 min*

(Differenz der Transparenz zum Zeitpunkt 0 und 30 min)
Werte nach dem Partus in ( )

Kaninchen	Klärfaktoraktivität zu verschiedenen Zeitpunkten (Abstände in Tagen)									
	0	1	3	5	7	10	12	14	16	21
1	8,0			11,5		14,0	(25)	(29,5)		
2	4,5			8,5		11,5	(21,5)	(23,5)		
3	13,5			3,0		15,0	24,5	19,5	24,0	
4	21,5			0,0		17,0	(7,0)	(14,0)	(22,0)	
5	3,0			2,5		18,5	12,0	9,0	(20,0)	
6	19,5			9,0		18,0	18,0	17,0	18,5	
7	8,0	2,0						8,0		14,5
8	32,0		22,5	15,0	20,5					
9	27,5		8,5	9,0	14,0					
10	37,5		14,0	(20,0)						
11	38,0		(24,5)							
12	34,5		12,0	8,5	22,0					
Ratten (gegen Ende der Tragzeit)										
1	24,0									
2	20,0									
3	4,5									
4	15,0									
5	21,0									
6	5,0									

Werte von Kontrolltieren vgl. Tab. 1.

Diskussion. Die Ursache für das auffällige Verhalten des Klärfaktors bei trächtigen Tieren ist völlig unklar. Es liegt nahe, endokrine Faktoren für Erklärungsversuche heranzuziehen, um so mehr als die Klärfaktoraktivität bei Ratten durch Progesteron vermindert wird[3]. Wir haben deshalb die im folgenden zu beschreibenden Untersuchungen über den

Einfluß von Oestradiol, Progesteron und gonadotropem Hormon durchgeführt. Anderweitige Erklärungsversuche, wie die Annahme von Plasmaproteinveränderungen, bleiben rein hypothetisch.

III. Weibliche Geschlechtshormone und Klärfaktor-Aktivierbarkeit

Die Verminderung der Klärfaktor-Aktivierbarkeit bei trächtigen Tieren legte die Untersuchung des Einflusses von Oestradiol, Progesteron und gonadotropem Hormon auf den Klärfaktor nahe.

Versuchsanordnung. 3 Gruppen zu je 4 Kaninchen wurden wie folgt behandelt:

1. Gruppe: 2,5 mg Oestradiol* i.m. am 1. Versuchstag
2. Gruppe: 12,5 mg Progesteron** i.m. am 1. Versuchstag
3. Gruppe: Je 70 RE gonadotropes Hormon*** i.m. an den 3 ersten Versuchstagen.

Die Technik der Klärfaktorbestimmung wurde bei I. beschrieben. Die erste Bestimmung erfolgte vor Behandlungsbeginn. Weitere Bestimmungen wurden am 2. und 7. Versuchstag ausgeführt.

Ergebnisse. Eine Beeinflussung der Klärfaktor-Aktivierbarkeit durch die Hormonbehandlung ist nicht zu erkennen. Die Mittelwerte liegen durchwegs im Bereich der Norm (vgl. Tab. 1 u. 3).

Tabelle 3. *Beeinflussung der Klärfaktor-Aktivierbarkeit durch weibliche Geschlechtshormone und gonadotropes Hormon beim Kaninchen*
Klärfaktoraktivität (= Zunahme der Lichtdurchlässigkeit des Substrats innerhalb 30 min als Differenz der Transparenz zum Zeitpunkt 0 und 30 min) nach i.v. Injektion von 2 mg/kg Heparin

Kaninchen	Behandlung	Klärfaktoraktivität vor Behandlung Mittelwert ± 2 m[1]	2 Tage später Mittelwert ± 2 m[1]	7 Tage später Mittelwert ± 2 m[1]
1	0,25 cm³ Ovocyclin M	16,0	19,0	20,0
2		23,5	25,0	—
3		31,5	26,0	22,0
4		20,5	26,5	27,0
		22,9 ± 6,55	24,1 ± 3,5	23,0 ± 3,5
5	0,25 cm³ Lutocyclin M	27,0	29,0	25,0
6		26,0	26,0	24,0
7		18,5	25,5	15,0
8		24,0	9,0	19,0
		23,9 ± 2,4	22,5 ± 9,0	20,8 ± 4,6
9	je 0,7 cm³ Pregnyl am 1.—3. Tag	19,0	16,5	25,0
10		20,5	25,5	26,5
11		24,0	23,5	30,0
12		24,0	12,0	21,0
		21,9 ± 2,5	19,4 ± 6,2	25,8 ± 3,8

[1] $m = \sqrt{\frac{S(x - \bar{x})^2}{(N-1) \cdot N}}$

* Verwendet wurde Ovocyclin M (Ciba).
** Verwendet wurde Lutocyclin M (Ciba).
*** Verwendet wurde Pregnyl (Organon).

Diskussion. Wir konnten die Befunde, die Cairns[3] an der Ratte erhoben hat, am Kaninchen nicht bestätigen. Die Annahme, daß die bei trächtigen Tieren beobachtete Klärfaktorhemmung durch hormonale Faktoren zu erklären sei, konnte durch den Versuch nicht gestützt werden.

IV. Alloxandiabetes und Klärfaktor-Aktivierbarkeit

Von Hadley[4] wurde mitgeteilt, daß die Klärfaktor-Aktivierbarkeit alloxandiabetischer Ratten deutlich vermindert sei. Wir versuchten diese Befunde zunächst am Kaninchen, dann an der Ratte zu reproduzieren.

Versuchsanordnung. *Behandlung der Versuchstiere.* a) Kaninchen: 12 Versuchstiere erhielten eine i.v. Injektion von 150 mg/kg Alloxan. 6 Versuchstiere gingen ein. Bei zweien konnte vorher eine Klärfaktorbestimmung ausgeführt werden, und zwar am 3. Versuchstag wie bei den übrigen untersuchten Versuchstieren. Eine zweite Bestimmung wurde bei den 6 überlebenden Tieren am 14. Versuchstag ausgeführt. Bei sämtlichen Versuchstieren wurde vor Ausführung dieser Bestimmungen mehrfach ein Glykosurie nachgewiesen.

b) Ratten erhielten intraperitoneale Injektionen von 150 mg/kg Alloxan, zum Teil mehrfach wiederholt. Eine Bestimmung der Klärfaktor-Aktivierbarkeit wurde 2—6 Tage nach der (letzten) Alloxaninjektion ausgeführt.

Technik der Bestimmung der Klärfaktoraktivität wie unter I.

Ergebnisse. Ungefähr in der Hälfte der Fälle wurden pathologisch niedrige Werte gefunden (vgl. Tab. 4).

Tabelle 4. *Klärfaktor-Aktivierbarkeit bei alloxandiabetischen Kaninchen und Ratten*
Klärfaktoraktivität (= Zunahme der Lichtdurchlässigkeit des Substrats innerhalb 30 min als Differenz der Transparenz zum Zeitpunkt 0 und 30 min) nach i.v. bzw. i.p. Injektion von 2 mg/kg Heparin

Kaninchen	Zeit nach Alloxaninjektion in Tagen		Ratten	Zeit nach Alloxaninjektion in Tagen	
	3	14		3	14
1	8,5	29,5	1	0,0	—
2	17,0	32,5	2	0,5	—
3	0,0	26,5	3	0,0	—
4	10,0	13,5	4	24,0	—
5	5,5	8,0	5	36,5	—
6	26,0	32,5	6	26,5	—
7	30,5	—	7	35,0	—
8	34,0	—	8	31,0	—
—	—	—	9	6,5	—

Diskussion. Nach Angaben von Hadley[4] erwarteten wir eine regelmäßige Verminderung der Klärfaktor-Aktivierbarkeit, stellten jedoch zunächst bei Kaninchen fest, daß dies nur bei einem Teil der Versuchstiere zutrifft. Auch die Wiederholung des Versuches an Ratten führte zum selben Ergebnis. Die Verhältnisse sind hinsichtlich der Unregel-

mäßigkeit der zu beobachtenden Beeinträchtigung der Klärfaktor-Aktivierbarkeit mit denjenigen bei den trächtigen Versuchstieren vergleichbar.

Über den Wirkungsmechanismus des Alloxans bzw. die Beeinträchtigung der Klärfaktor-Aktivierbarkeit durch den Alloxandiabetes sind vorläufig nur Spekulationen möglich. Nimmt man an, daß es sich beim Klärfaktor um eine an Heparin gekoppelte Erscheinungsform der Pankreaslipase handelt, wie dies von OVERBEEK[9] vorgeschlagen wird, so wäre denkbar, daß Alloxan eine funktionelle Schädigung des Pankreas auch hinsichtlich der Lipasebildung bewirkt und daß es so zu einer Klärfaktorverminderung kommt, die der von OVERBEEK bei pankreatektomierten Hunden beobachteten in Parallele zu setzen wäre.

Neueste klinische Beobachtungen[10] haben ergeben, daß bei Patienten mit Diabetes mellitus sowohl eine Erhöhung der Klärfaktor-Aktivierbarkeit beobachtet werden kann — nämlich bei Patienten *ohne* Arteriosklerose — als auch eine beträchtliche Verringerung derselben bei Patienten *mit* ausgebildeter Arteriosklerose. Da jedoch die Verhältnisse des Alloxandiabetes ganz allgemein nicht ohne weiteres mit denjenigen des menschlichen Diabetes mellitus verglichen werden können, ist es fraglich, ob eine Parallele zwischen diesen Beobachtungen überhaupt gesucht werden darf.

Die mitgeteilten Befunde scheinen darauf hinzuweisen, daß der Klärfaktor eine in physiologische und pathologische Steuer- und Regulationsmechanismen einbezogene Größe darstellt. Die wenigen vorliegenden Daten lassen sinnvolle Zusammenhänge vorläufig nicht erkennen. Das in Bruchstücken vorliegende Mosaik ruft jedoch nach einer Ergänzung zum fertigen Bild.

Summary

1. In rats and rabbits, clearing factor activation by heparin injections regularly undergoes a transient reduction after liver damage by carbon tetrachloride. In the rat, an increased activity (spontaneous as well as subsequent to heparin activation) follows in a later phase.

2. In pregnant rats and rabbits, clearing factor activation is liable to be considerably reduced, although sometimes only temporarily. Normalization usually sets in several days before parturition.

3. Rabbits treated with estradiol, progesterone, and gonadotropic hormone showed normal clearing factor activation.

4. In some alloxan-diabetic rats and rabbits, reduction of clearing factor activation is observed.

Literatur

[1] ANFINSEN, C. B., E. BOYLE and R. K. BROWN: The role of heparin in lipoprotein metabolism. Science **115**, 583 (1952).

[2] BAKER, P. S.: A standardized in vitro method for evaluation of clearing factor response in man. Its application to agewise study. Circulation **14**, 496 (1956).

[3] Cairns, A., and P. Constantinides: Endocrine effects on the heparin induced lipaemia clearing activity of rat plasma. Canad. J. Biochem. **33**, 530 (1955).
[4] Hadley, J. L., and H. C. Meng: Pancreas and the production of lipaemia clearing factor. Circulation **14**, 493 (1956).
[5] Hahn, P. F.: Abolishment of alimentary Lipemia following Injektion of Heparin. Science **98**, 19 (1943).
[6] Jeffries, G. H.: The sites at which plasma clearing activity is produced and distroyed in the rat. Quart. J. exp. Physiol. **39**, 261 (1954).
[7] Kaufmann, H., G. Dourdon, D. Lyon, J. Payot et P. Isorni: Le facteur d'eclaircissement dans la maladie de Bouillaud. Arch. Mal. Coeur **49**, 147 (1956).
[8] Myers, D. K., A. Schotte and B. Mendel: Studies on aliesterases and other lipid-hydrolysing enzymes. Biochem. J. **60**, 481 (1955).
[9] Overbeek, G. A.: Fatt-Spliting enzymes in blood. Clin. chim. Acta **2**, 1 (1957).
[10] Stork, A., u. L. Kucerova: Die Klärungsfähigkeit des Blutplasmas und Veränderungen des Plasmacholesterinspiegels nach intravenöser Heparininjektion bei Diabetikern und Arteriosklerotiker. Dtsch. med. Wschr. **1957**, 1410.
[11] Studer, A.: Heparinwirkung bei experimenteller Leberschädigung. Acta haemat. (Basel) **3**, 278 (1950).

Dr. K. Reber,
Abteilung für experimentelle Medizin der F. Hoffmann-La Roche & Co. AG.,
Basel (Schweiz)

Arch. exper. Path. u. Pharmakol., Bd. 233, S. 393—408 (1958)

Aus dem Pharmakologischen Institut der Universität Frankfurt a. M.
(Direktor: Prof. Dr. P. Holtz)

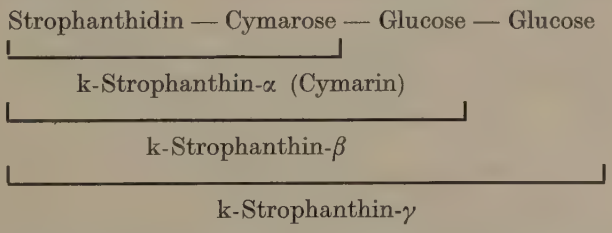
Über die Spaltung herzwirksamer Glykoside im Tierkörper*

Von
Ruth Engler**, P. Holtz und H. W. Raudonat

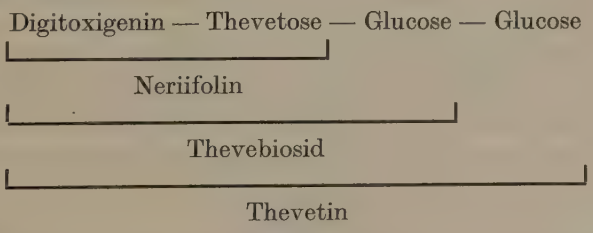
Mit 3 Textabbildungen

(Eingegangen am 21. Dezember 1957)

Die glykosidhaltigen Pflanzen, z. B. die verschiedenen *Digitalis-* und *Strophanthus*arten, besitzen in ihren Blättern bzw. Samen Fermente, die als spezifische *Glucosidasen* die mit den Geninen ätherartig verbundenen Zuckermoleküle abzuspalten vermögen (Jacobs u. Hoffmann). Extrakte aus *Semen Strophanthi* enthalten neben k-Strophanthin -γ und -β auch kleine Mengen Cymarin (k-Strophanthin -α). Bei der Inkubation wäßriger Extrakte (1:10) wird — wie wir auch in eigenen Versuchen fanden — mit fortschreitender Inkubationsdauer das im Extrakt vorhandene k-Strophanthin -γ zunehmend durch hydrolytische Abspaltung der beiden Glucosereste in k-Strophanthin -α umgewandelt, das mit dem auch im *Apocynum cannabinum* vorkommenden *Cymarin* identisch ist.



Eine entsprechende Aufspaltung des im gelben Oleander (Thevetia neriifolia) vorkommenden Glykosids *Thevetin* würde zur Entstehung von *Neriifolin* führen.



* Ausgeführt mit Unterstützung der Deutschen Forschungsgemeinschaft.

** Ausführliche Wiedergabe der Versuchsprotokolle in der Dr.-Dissertation Ruth Engler, Frankfurt a. M. 1958.

Wenn auch die vom Steran sich ableitenden *Aglucone* oder *Genine* Träger der spezifischen pharmakologischen Wirkung sind, so wird diese doch durch die im Glykosidmolekül enthaltenen Zucker maßgeblich beeinflußt. Die Genine sind in den meisten Fällen weniger wirksam als die Glykoside, und die Zahl und Art der Zucker ist für die Löslichkeit, die Resorption und Elimination, ferner für die Bindung an die Bluteiweißkörper sowie für die Haftfestigkeit im Herzmuskel und damit für die Geschwindigkeit des Wirkungseintritts und die Wirkungsdauer von Bedeutung.

Da zu *therapeutischen* Zwecken im allgemeinen die *Glykoside* Anwendung finden, ist die Frage von Interesse, ob — ähnlich wie in den *Pflanzen* — auch im *Tierkörper* eine hydrolytische Aufspaltung zu zuckerärmeren Spaltstücken möglich ist. Diese Frage ist wiederholt mit *pharmakologischen* Methoden bearbeitet worden, ohne daß die bisherigen Ergebnisse zu einer Lösung geführt hätten (Literatur bei Lendle, Neumann, Weese). So ist bis heute nicht entschieden, ob neben einem an den Geninen angreifenden Abbau auch eine hydrolytische Aufspaltung der Glykosidmoleküle erfolgt. Auch neuere Untersuchungen mit Extrakten und Trockenpulver aus tierischen Organen (Stoll u. Renz) sind nicht geeignet, Aufschluß darüber zu geben, ob und in welchem Umfang eine Zuckerabspaltung am Abbau der Glykoside im *Organismus* tatsächlich beteiligt ist.

In Untersuchungen über die Wirkung herzwirksamer Glykoside auf den *Elektrolythaushalt* (Greeff) hatte sich zeigen lassen, daß die bei *Ratten* zu vermehrter renaler Ausscheidung von *Kalium* führende *orale* Verabfolgung von *Strophanthin* und *Thevetin* durch eine mehrstündige Latenz der Wirkung gekennzeichnet ist, die der kaliuretischen Wirkung der glucosefreien Spaltprodukte — des *Cymarins* und *Neriifolins* — fehlt. Bei peroraler Zufuhr von *Cymarin* bzw. *Neriifolin* wurde das Maximum der Kaliurie nach 2 Std, bei oraler Verabfolgung gleichwirksamer Mengen von *k-Strophanthin -γ* bzw. *Thevetin* erst nach 6 Std erreicht. Im Gegensatz zu Strophanthin hatte Thevetin diese mehrstündige Latenz der Wirkung auch bei *subcutaner* Injektion. Das legte die Annahme nahe, daß der *Resorption* der *beiden* Glykoside —, und dem *Wirksamwerden* des *Thevetins* auch nach parenteraler Applikation — eine Abspaltung der Glucosereste voraufgehen müsse.

Im folgenden berichten wir über Versuche an *Ratten*, in denen nach oraler und subcutaner Verabfolgung von *k-Strophanthin -γ* und *Thevetin* die Ausscheidungen der Versuchstiere — *Harn* und *Kot* — sowie die *Galle* mit Hilfe *papierchromatographischer* Methoden auf Spaltprodukte der Glykoside untersucht wurden. Nachdem diese Untersuchungen zu positiven Ergebnissen geführt hatten, sollten weitere Versuche Aufschluß darüber geben, *wo* im Organismus die hydrolytische Spaltung erfolgt.

Methoden

1. Gruppen von 5—10 weißen Ratten (200 g) wurden mit 5 cm³ je Tier Aqua dest. oral vorgewässert und erhielten 2 Std später 2 mg k-Strophanthin -γ bzw. 2 mg Thevetin in je 5 cm³ Aqua dest. gelöst oral. Anschließend wurden die Tiere

noch 4mal alle 2 Std mit je 5 cm³ Aqua dest. gewässert (nach 2, 4, 6 u. 8 Std), sodann noch einmal nach 20 und nach 30 Std. Vor jeder Wässerung wurde die Harnblase entleert und 10 min lang Hafer und Gerste angeboten. Der während der einzelnen Wässerungsperioden ausgeschiedene Harn und Kot wurde getrennt aufgefangen und aufgearbeitet. In einigen Versuchen wurden die Tiere 4 Std nach der letzten Wässerung getötet, und der während der gesamten Versuchszeit ausgeschiedene Harn sowie der ausgeschiedene Kot zusammen mit dem Darm und Darminhalt untersucht. Die Aufarbeitung machte sich zunutze, daß die Glykoside sowohl als die glucosefreien Spaltprodukte — *Cymarin* (k-Strophanthin -α) und *Neriifolin* — löslich in *Alkohol*, aber nur die letzteren auch in *Chloroform* leicht löslich sind.

2. Aufarbeitung von Harn und Kot. Der *Harn* wurde 3mal mit dem doppelten Volumen Chloroform ausgeschüttelt. Der nach dem Abdampfen verbleibende Rückstand, der etwa entstandene glucosefreie Abbauprodukte hätte enthalten müssen, wurde in wenig $CHCl_3$ aufgenommen und papierchromatographiert. — Die mit $CHCl_3$ ausgeschüttelte wäßrige Phase, in der sich gegebenenfalls glucosehaltige Glykoside befunden hätten, wurde im Vakuum zur Trockne eingedampft, und der Rückstand mit Methanol am Rückflußkühler 30 min lang extrahiert. Der vom Rückstand abfiltrierte Extrakt wurde wiederum eingedampft und papierchromatographiert.

Kot und *Darm* wurden im Mörser mit Quarzsand verrieben und mit der 5fachen Menge Äthanol (80%ig) am Rückflußkühler extrahiert. Der nach dem Filtrieren verbleibende Rückstand wurde mit 80%igem Äthanol nachgewaschen; die vereinigten alkoholischen Lösungen wurden im Vakuum auf etwa die Hälfte eingeengt. Durch Ausschütteln mit Tetrachlorkohlenstoff wurde das Fett entfernt. — Die weitere Aufarbeitung erfolgte wie beim Harn: Ausschüttelung mit Chloroform usw.

3. Papierchromatographische Untersuchungen. Schl. & Sch. 2043b. — Zur Auftrennung *glucosehaltiger* Glykoside Verteilungschromatographie *descendierend:* butanol-gesättigtes Wasser (stationäre Phase); wassergesättigtes Butanol (mobile Phase). — Zur Auftrennung *glucosefreier* Spaltprodukte (Cymarin, Neriifolin, Strophanthidin, Digitoxigenin) Verteilungschromatographie *ascendierend: Formamid* — 20%ig in Aceton aufgetragen, Aceton verdunsten lassen — (stationäre Phase); *Xylol/Methyläthyketon* = 1/1 — formamidgesättigt — (mobile Phase). *Oder descendierend:* Benzol/Methanol/Wasser/Äthylacetat = 10/10/10/2. — *Test-Chromatogramm:* jeweils 100 γ der Testsubstanz in 0,01—0,1 cm³ Lösungsmittel.

Qualitativer Nachweis (Steroidanteil): Anfärbung durch Besprayen mit einem Gemisch aus 15 Teilen alkohol. Trichloressigsäure (25%ig) + 1 Teil Chloramin (3%ig). Nach 5 min langem Erhitzen des Papiers auf 120° C (Brutschrank) treten die Steroide als im UV-Licht gelb fluorescierende Flecken auf. — Ein zweites Chromatogramm wurde mit einem Gemisch aus Essigsäureanhydrid/Chloroform/Schwefelsäure (conc.) = 20/50/1 besprayt und 5—6 min auf 90° C erhitzt. Hierbei treten die Steroide als fahlblaue oder gelbliche Fluorescenzen im UV-Licht auf. — In einigen Versuchen wurde ein Chromatogrammstreifen mit einem Gemisch aus gleichen Teilen m-Dinitrobenzol (2%ig in Methanol) und KOH (1%ig) besprayt und 5 min auf 100° C erhitzt. Eine dann auftretende blau-violette Färbung ist charakteristisch für den 5-Lactonring des Digitoxigenins und Strophanthidins.

Quantitative Bestimmung. a) Strophanthidinderivate. Die den angefärbten, fluorescierenden Flecken entsprechenden Stellen des Chromatogramms wurden ausgeschnitten und mit je 2 cm³ 96%igem Äthanol, das vorher über Aktivkohle (Merck) destilliert worden war, anschließend noch 2mal mit je 1 cm³ Äthanol eluiert.

Die insgesamt 4 cm³ Eluat wurden nach den Angaben von Goldschmidt, Helmreich u. Körber zu 6,6 cm³ eisgekühlter conc. H_2SO_4 unter Schütteln tropfenweise zugegeben und nach 1stündigem Stehen bei Zimmertemperatur im Photometer

(Elko-Zeiss, Filter Hg 436) gegen einen alkohol. Extrakt aus einem entsprechend großen leeren Papierstück (Leerwert) colorimetriert und mit Hilfe einer Eichkurve berechnet, die mit alkoholischen Lösungen der Reinsubstanzen (Strophanthidin, Cymarin sowie k-Strophanthin -β und -γ) aufgestellt worden waren.

Digitoxigeninderivate. Die Elution erfolgte mit je 10 cm³ Methanol. Je 5 cm³ der Eluate wurden nach Tschesche mit je 5 cm³ Pikrinsäureagens (Pikrinsäure [1%ig] in 2%iger NaOH) gemischt und nach $^1/_2$stündigem Stehen gegen „Leer-Eluate" wie unter a) colorimetriert (Elko-Zeiss, Filter S 53). Eichkurve mit alkohol. Lösungen der Reinglykoside (Neriifolin, Thevetin).

Verwendete Substanzen: k-Strophanthin -γ; k-Strophanthin -β; Cymarin; Strophanthidin der Firma C. F. Boehringer (Mannheim). — Thevetin, Thevebiosid, Neriifolin der Firma C. H. Boehringer (Ingelheim)[1].

Versuche

1. Ausscheidung von Cymarin bzw. Neriifolin in Harn und Kot nach Verfütterung von k-Strophanthin -γ bzw. Thevetin

Qualitativer Nachweis. Versuche, in denen je einer Ratte 1mal oder mehrere Male im Abstand von 4 Std je 2 mg k-Strophanthin -γ bzw. 2 bis 4 mg Thevetin, in 5 cm³ Aqua dest. gelöst, mit der Schlundsonde verabfolgt wurden, hatten ergeben, daß im Harn und Kot (bzw. Darm + Kot) Steroidverbindungen auftraten, deren R_f-Werte nach Rechromatographie mit denjenigen des Cymarins bzw. Neriifolins übereinstimmten.

Versuchsbeispiel. Eine Ratte (200 g) erhielt am 1. Versuchstag um 8, 12, 16 und 19 Uhr, am 2. Versuchstag nochmals um 8 Uhr je 2 mg *k-Strophanthin-γ* in 5 cm³ Aqua dest. Eine zweite Ratte erhielt zu denselben Zeiten je 4 mg *Thevetin.* — 3 Std nach der letzten Strophanthin- bzw. Thevetingabe wurden beide Tiere getötet. Der während des Versuchs sezernierte Harn (28 bzw. 30 cm³) sowie der ausgeschiedene Kot (11 bzw. 12 g) zusammen mit dem gesamten Darm + Inhalt wurden aufgearbeitet (siehe Methodik).

Die Abb. 1 b stellt das im UV-Licht photographierte Papierchromatogramm der *Harn*aufarbeitung dar: im Harn der mit Strophanthin gefütterten Ratte ließ sich eine im UV-Licht gelblich fluorescierende Substanz nachweisen, deren R_f-Wert nach Rechromatographie demjenigen des reinen Cymarins entsprach (Abb. 1 c); daneben 2 „Metabolite", die auf Grund ihrer R_f-Werte weder k-Strophanthin -γ, noch Strophanthidin sein konnten (Abb. 1 d), andererseits noch eine positive Farbreaktion mit Dinitrobenzol-KOH gaben, die für den 5-Lactonring charakteristisch ist.

Ein Teil des verabfolgten k-Strophanthin -γ ist demnach unter Abspaltung der beiden Glucosemoleküle in k-Strophanthin -α (Cymarin) umgewandelt, ein anderer Teil bzw. ein Teil des entstandenen Cymarins entweder am Genin oder am Zuckerrest verändert worden, wobei der Lactonring intakt blieb.

Im *Kot* fand sich neben Cymarin *ein* „Metabolit", der sich papierchromatographisch wie der im Harn nachgewiesene „Metabolit" mit dem größeren R_f-Wert verhielt (Abb. 1 a).

[1] Den beiden Firmen danken wir für die Überlassung von Versuchsmengen.

Nach Verfütterung von Thevetin erscheint ebenfalls das glucosefreie Spaltstück — Neriifolin — im Harn, daneben ein „Metabolit", der sich chromatographisch ähnlich wie der aus Strophanthin entstandene „Metabolit I" verhält.

Auch im *Kot* und *Darm* ließ sich Neriifolin, daneben ein anderer „Metabolit" nachweisen.

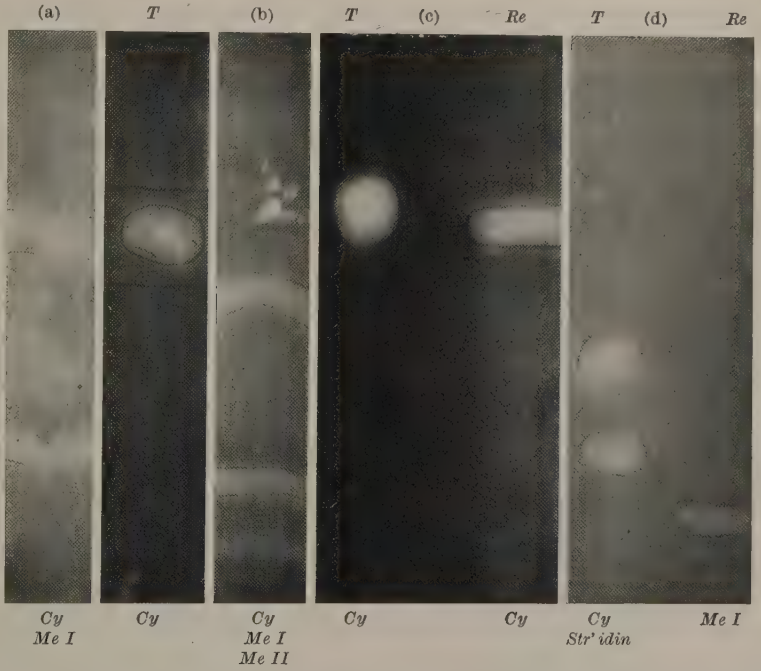


Abb. 1. Ausscheidung von Cymarin und anderen Metaboliten in Kot und Harn nach oraler Verabfolgung von k-Strophanthin-γ bei Ratten (siehe Text). *Fluorescenz-Chromatogramme:* a Kot- (+Darm-) extrakt; b Harnextrakt; c Rechromatogramm des Harn-Cymarins (Eluat); d Rechromatogramm des Harn-Metabolit I (Eluat). *Lösungsmittel:* Formamidgesättigtes Xylol/Methyläthylketon = 1:1. *Sprühreagens:* Alkoholische Trichloressigsäure (25%ig)/Chloramin (3%ig) = 15/1

Quantitative Bestimmung (siehe Methodik). a) 10 Ratten, auf 2 Diuresekäfige verteilt, erhielten nach Vorwässerung mit 5 cm³ Aqua dest. pro Tier 2 Std später (11 Uhr) je 2 mg *k-Strophanthin -γ* (insgesamt also 20 mg), in 5 cm³ Aqua dest. gelöst, oral. Anschließend wurden alle 2 Std (um 13, 15, 17, 19 Uhr) je 5 cm³ Aqua dest. mit der Schlundsonde verabfolgt. Am nächsten Tag (8 Uhr) erhielten die Tiere nochmals je 5 cm³ Aqua dest. — Der zwischen 11—13 Uhr, 13—15, 15—17 Uhr 17—19, 19—8 und 8—18 Uhr ausgeschiedene Harn und Kot wurde portionsweise aufgefangen und verarbeitet (siehe Methodik).

Das Ergebnis der quantitativen Bestimmung der ausgeschiedenen Steroidverbindungen (Cymarin, „Metabolit I" und „Metabolit II") ist in Tab. 1 dargestellt.

Das *Maximum* der Cymarinausscheidung sowohl im Harn als im Kot wird 6 Std nach der oralen Verabfolgung des Strophanthins erreicht,

aber noch zwischen der 21. u. 31. Std gelangen geringe Mengen zur Ausscheidung. Die insgesamt ausgeschiedenen Mengen an Cymarin und „Metaboliten" sind fast gleich groß: 712 γ Cymarin bzw. — auf Cymarin berechnet — 731 γ „Metabolite", zusammen also 1443 γ. Auf k-Strophanthin-γ berechnet, sind das 2300 γ, d.h. 11,5% der verfütterten 20 mg Strophanthin.

Die aus Strophanthin tatsächlich *entstandenen* Mengen der Abbauprodukte dürften wesentlich größer sein. In Kontrollversuchen, in denen z. B. 100 γ Cymarin

Tabelle 1. *Ausscheidung von Cymarin und anderen „Metaboliten" nach oraler Verabfolgung von k-Strophanthin-γ*

Nach Stunden	Harn cm³	Kot g	γ Cymarin		γ Metabolit I[1]		γ Metabolit II[1]	
			Harn	Kot	Harn	Kot	Harn	Kot
2 (11—13 Uhr)	45	15	24	59	15	43	—	52
4 (13—15 Uhr)	40	10	27	71	19	40	—	—
6 (15—17 Uhr)	47	18	52	205	35	—	27	32
8 (17—18 Uhr)	43	16	51	88	33	24	—	32
21 (19—8 Uhr)	62	24	21	75	27	133	28	59
31 (8—18 Uhr)	69	30	39	—	36	44	31	21
Insgesamt	306	113	214	498	165	284	86	196
			712		449		282	

[1] Als Cymarin berechnet.

zur Chromatographie aufgetragen wurden, fanden sich im Eluat nur 65—70 γ wieder; das steht im Einklang mit den Befunden anderer Autoren (Haack u. Mitarb.), die bei der chromatographischen Bestimmung von Herzglykosiden etwa 20% Verluste angeben. Mit noch größeren Verlusten ist natürlich zu rechnen, wenn entstandene „Metabolite" erst aus Organextrakten oder aus Harn und Kot isoliert werden müssen, bevor sie papierchromatographisch bestimmt werden.

Erstaunlich ist, daß sowohl Cymarin als auch die beiden „Metaboliten" sich schon nach 2 Std nicht nur im Harn, sondern auch im ausgeschiedenen *Kot* finden, und daß überhaupt die mit dem *Kot* ausgeschiedenen Mengen der Abbauprodukte weit größer sind — doppelt so groß — als die im *Harn* ausgeschiedenen. Unverändertes Strophanthin ließ sich weder im Harn, noch im Kot nachweisen.

b) In der gleichen Versuchsanordnung wie unter a) erhielten 10 Ratten je 2 mg *Thevetin* (insgesamt also 20 mg) oral. Die quantitative Bestimmung der mit dem Harn und Kot ausgeschiedenen Steroidverbindungen (Neriifolin und „Metabolit" I) hatte das in der Tab. 2 dargestellte Ergebnis.

Nach oraler Verabfolgung von *Thevetin* lassen sich ungefähr 5mal größere Mengen des glucosefreien Spaltproduktes *(Neriifolin)* im Harn

und Kot nachweisen, als *Cymarin* nach Verabfolgung von Strophanthin. Die Gesamtausscheidung während des Versuches beträgt 3989 γ Neriifolin und — auf Neriifolin berechnet — 3916 γ „Metabolit" I, zusammen also 7905 γ. Auf Thevetin berechnet, ergeben das rund 10 mg, d. h. ungefähr 50% der verfütterten 20 mg Thevetin. — Auch hier fällt auf, daß unverändertes Thevetin weder im Harn noch im Kot nachweisbar war, daß andererseits sowohl Neriifolin als auch der andere „Metabolit" schon während der ersten 2 Std im Kot erschienen. Wie nach Ver-

Tabelle 2. *Ausscheidung von Neriifolin und einem anderen „Metaboliten" nach oraler Verabfolgung von Thevetin*

Nach Stunden	Harn cm³	Kot g	γ Neriifolin		γ Metabolit[1]	
			Harn	Kot	Harn	Kot
2 (11—13 Uhr)	42	17	—	300	320	334
4 (13—15 Uhr)	45	20	147	960	267	—
6 (15—17 Uhr)	48	11	214	480	214	480
8 (17—19 Uhr)	41	14	200	487	360	320
21 (19—8 Uhr)	73	26	534	667	767	374
31 (8—18 Uhr)	69	31	—	—	480	—
Insgesamt	318	119	1095	2894	2408	1508
			3989		3916	

[1] Als Neriifolin berechnet.

fütterung von k-Strophanthin -γ das entstandene *Cymarin* in größerer Menge mit dem Kot als mit dem Harn ausgeschieden wurde, trifft das auch für das aus Thevetin entstandene *Neriifolin* zu. Anders hingegen verhält sich der aus Thevetin gebildete „Metabolit". Im Gegensatz zu den „Metaboliten" des Strophanthins erscheint er im Harn in größerer Menge als im Kot.

2. Ausscheidung von Cymarin in Harn und Kot nach subcutaner Injektion von k-Strophanthin -γ

Schon 2 Std nach der *oralen* Verabfolgung von Strophanthin und Thevetin erschienen die glucosefreien Spaltstücke — Cymarin, Neriifolin —, sowie andere „Metabolite" im Harn und im Kot. Das so frühzeitige Auftreten von Abbauprodukten der Glykoside im *Kot* macht es unwahrscheinlich, daß diese — im Magen-Darmtrakt entstanden — auf dem Wege einer durch den ganzen Darm hin erfolgenden Passage zur Ausscheidung gelangen. Wahrscheinlicher ist, daß sie nach der Resorption der Glykoside unter Ausscheidung in den Enddarm im Kot erscheinen. Wenn das zutrifft, müßten sie auch nach *parenteraler* Verabfolgung der Glykoside nicht nur im Harn, sondern auch im Kot auftreten.

Wir haben 20 Ratten (200 g) 3mal im Abstand von 4 Std je 0,2 mg k-Strophanthin -γ *subcutan* injiziert und den in 24 Std ausgeschiedenen

Harn und *Kot* auf *Cymarin* untersucht. Das Ergebnis der nur qualitativen papierchromatographischen Untersuchung war, daß sich sowohl im Harn als im Kot Cymarin nachweisen ließ.

Auch nach subcutaner Injektion von *Cymarin* läßt dieses sich in Harn und Kot nachweisen.

3 Ratten erhielten 4mal im Abstand von 3 Std je 0,5 mg Cymarin (in 0,2 cm³ 20%igem Propylenglykol gelöst) *subcutan*, gleichzeitig je 5 cm³ Aqua dest. oral. Der in 24 Std ausgeschiedene Harn (80 cm³) und Kot (35 g) wurde aufgearbeitet. In diesem und in 3 weiteren Versuchen ließ sich Cymarin sowohl im Harn als im Kot nachweisen.

Damit dürfte erwiesen sein, daß eine Ausscheidung nicht nur in den Harn, sondern auch in den Darm erfolgt. Gleichzeitig wird wahrscheinlich, daß das auch nach *oraler* Zufuhr von Strophanthin schon 2 Std später mit dem Kot ausgeschiedene Cymarin nicht *durch Darmpassage*, sondern nach voraufgegangener Resorption *durch Ausscheidung* in den Kot gelangt. Offen bleibt die Frage, ob k-Strophanthin -γ als solches, oder erst nach Abspaltung der beiden Glucosemoleküle als Cymarin aus dem Magen-Darmtrakt resorbiert wird.

3. Ausscheidung von k-Strophanthin -γ in die Galle nach oraler Verabfolgung

Bei Ratten in Urethannarkose wurden feine, aus Polyäthylen bestehende Kanülen in den *Ductus choledochus* eingeführt, und die austretende *Galle* nach oraler Zufuhr von k-Strophanthin -γ auf Strophanthin und Cymarin untersucht.

Die aufgefangene Galle wurde mit der 10fachen Menge Äthanol versetzt, der entstehende Niederschlag abzentrifugiert, mit einer kleinen Menge Äthanol gewaschen und die vereinigten alkoholischen Lösungen im Vakuum zur Trockne eingedampft. Der in Aqua dest. aufgenommene Rückstand wurde im gleichen Kölbchen 3mal mit je 25 cm³ Chloroform ausgeschüttelt. Nach dem Eindampfen der Chloroformauszüge wurde in 0,15 cm³ Chloroform-Alkohol (1:1) aufgenommen und chromatographiert *(Cymarin)*. — Die wäßrige Phase wurde ebenfalls zur Trockne eingedampft, und der Rückstand, in 0,15 cm³ Chloroform-Alkohol gelöst, papierchromatographisch untersucht *(k-Strophanthin -γ)*.

In 3 Versuchen, in denen je 3 Ratten 3—4mal im Abstand von 2 Std je 1 mg k-Strophanthin -γ in 2 cm³ Aqua dest. oral verabfolgt worden war, ließ dieses, nicht Cymarin, sich in der während 6—8 Std sezernierten *Galle* (7—9 cm³) nachweisen. k-Strophanthin -γ kann demnach auch als intaktes Molekül — ohne vorausgehende Aufspaltung zu Cymarin — aus dem Magen-Darmtrakt resorbiert werden.

Es ergibt sich, daß nach oraler Verabfolgung von k-Strophanthin -γ sich im *Harn* und *Kot* Cymarin und andere „Metabolite", nicht aber unverändertes Strophanthin nachweisen lassen, daß jedoch in die *Galle* das unveränderte Glykosid ausgeschieden wird. Es entsteht die Frage, *wo* im Organismus die Spaltung in Cymarin und Glucose erfolgt.

4. Inkubationsversuche

Nach Inkubation von k-Strophanthin -γ mit Homogenaten und Extrakten aus *Leber, Niere, Darm* (Duodenum mit Inhalt) und *Skeletmuskel* von Ratten sowie aus Schweinedarm und -pankreas unter Zusatz von Toluol (10—24 Std bei 37° C) ließ sich eine Aufspaltung zu Cymarin nicht nachweisen. Den Organextrakten *zugesetztes* Cymarin fanden wir wieder, zugesetztes k-Strophanthin -γ nur dann, wenn die Extrakte bzw. Homogenate vor der Aufarbeitung einer Verdauung mit Trypsin unterworfen wurden. Das Vollglykosid wird offenbar — im Gegensatz zum glucosefreien Cymarin — sofort und so fest gebunden, daß es nicht mehr mit organischen Lösungsmitteln extrahierbar ist.

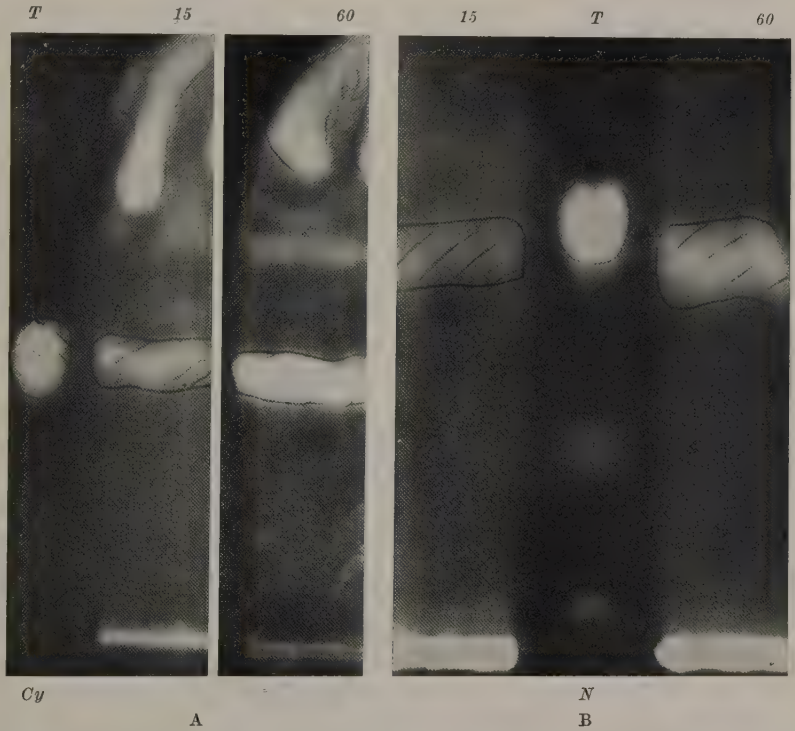


Abb. 2. A Entstehung von Cymarin bei Inkubation von k-Strophanthin-γ mit Rattenkot (siehe Text); B Entstehung von Neriifolin bei Inkubation von Thevetin mit Rattenkot. *Fluorescenz-Chromatogramme: T* Test (100 γ Cymarin bzw. Neriifolin), Extrakte der Inkubate nach 15 min u. 60 min (siehe Methodik)

Die Chromatogramme in Abb. 2 A entsprechen *einem* von 3 Versuchen, in denen *Rattenkot*, 1 : 10 mit 0,9%iger NaCl-Lösung im Mörser verrieben, mit k-Strophanthin -γ bei 37° C inkubiert wurde (1 mg Strophanthin je 1 g Kot).

Man sieht, daß schon nach 15 min langer Bebrütung *Cymarin* nachweisbar wird und mit fortschreitender Inkubationszeit an Menge zunimmt. Damit wird wahrscheinlich, daß die nach subcutaner und oraler

Verabfolgung von *k-Strophantin -γ* erfolgende Aufspaltung zu *Cymarin* unter Mitwirkung von Mikroorganismen im *Darm* stattfindet. Das hier gebildete Cymarin wird dann zum Teil mit dem *Kot* ausgeschieden, zum Teil resorbiert und in den *Harn* ausgeschieden. — Bei Inkubation von *Thevetin* mit Rattenkot entsteht ebenfalls das glucosefreie Spaltprodukt: Neriifolin (Abb. 2 B).

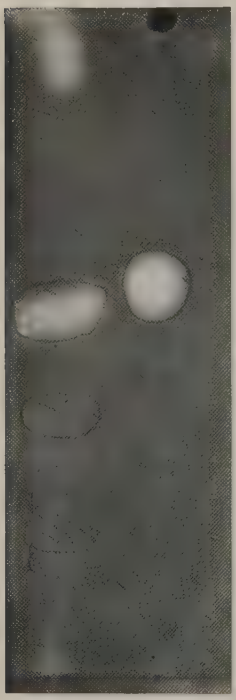


Abb. 3. Ausscheidung von Cymarin und anderen Metaboliten in den Harn nach rectaler Verabfolgung von Cymarin (siehe Text). *Fluorescenz-Chromatogramm: H* Harnextrakt; *T* Test; *Cy* Cymarin; *Me I, II* Metabolit I, II

5. Ausscheidung von Cymarin in den Harn nach rectaler Verabfolgung

6 Ratten erhielten je 2 mg *Cymarin* (in 0,5 cm³ Alkohol 15%ig) *rectal.* Leukoplaststreifen verhinderten das Wiederauslaufen der injizierten Lösung. 3 u. 7 Std später wurden je 5 cm³ Aqua dest. pro Tier mit der Schlundsonde gegeben und der in 20 Std sezernierte *Harn* aufgearbeitet.

Im Chromatogramm ließ sich Cymarin durch eine sehr starke, 2 Metabolite mit kleineren R_f-Werten durch schwache Fluorescenz nachweisen (Abb. 3). *Cymarin* wird demnach aus dem Enddarm resorbiert und anschließend in den Harn ausgeschieden.

6. Darmpassage

Die schon 2 Std nach der oralen Aufnahme von *Strophanthin* beobachtete Ausscheidung *kleiner Cymarinmengen* mit dem Kot wurde damit erklärt, daß ein Teil des im Dünndarm resorbierten und die Leber passierenden Strophanthins vom Blut aus in den Dickdarm ausgeschieden und hier zu Cymarin abgebaut wird. Das erst 4—6 Std nach der Verabfolgung von Strophanthin auftretende *Maximum* der Cymarinausscheidung im Harn könnte auf der Resorption *größerer* Cymarinmengen beruhen, die aus dem durch Darmpassage in den Dickdarm gelangten Strophanthin entstehen.

Bei *Mäusen* erfolgt die Darmpassage der Ingesta schnell: nach Versuchen von Schmid mit Verfütterung gefärbten Mehlbreis wurde schon nach 3 Std Farbstoff enthaltender Kot ausgeschieden. Wir haben *Ratten* alle 2 Std je 5 cm³ einer 0,1%igen *Neutralrot*lösung in 3%igem Mehlbrei mit der Schlundsonde verabfolgt, und die Tiere in verschiedenen Zeitabständen getötet: nach 2 Std findet sich rotgefärbter Darminhalt ungefähr 6 cm vor der Ileocöcalklappe, nach 3 Std unmittelbar vor der Klappe, nach 4 Std im Enddarm.

Es ist deshalb auch auf Grund dieser Versuchsergebnisse nicht wahrscheinlich, daß die nach oraler Gabe von Strophanthin schon 2 Std später mit dem Kot ausgeschiedenen kleinen Cymarinmengen sich von dem auf dem Darmwege in die tiefergelegenen Abschnitte beförderten Strophanthin herleiten; wahrscheinlicher ist, daß sie aus den zwar wohl nur geringfügigen Anteilen des Glykosids entstehen, die nach dessen Resorption im Dünndarm vom Blute her in den Dickdarm ausgeschieden und hier in Cymarin umgewandelt werden. Andererseits spricht die Beobachtung, daß der gefärbte Mehlbrei 4 Std nach der Verfütterung im Enddarm angelangt ist, dafür, daß das bei 4—6 Std liegende *Maximum* der Cymarinausscheidung im Harn durch die Resorption größerer Cmyarinmengen zustande kommt, die aus dem durch Darmpassage in die unteren Darmabschnitte gelangten Strophanthin hier gebildet werden.

Besprechung der Versuchsergebnisse

Wesentliche Ergebnisse unserer Untersuchungen sind: 1. daß sowohl nach oraler als nach subcutaner Verabfolgung von *k-Strophanthin -γ* bzw. *Thevetin* bei Ratten neben anderen „Metaboliten" die glucosefreien Spaltprodukte — *Cymarin* bzw. *Neriifolin* — im Harn und Kot auftreten und hier schon 2 Std nach der Zufuhr der Glykoside nachweisbar werden; 2. daß *k-Strophanthin -γ* nach oraler Verabfolgung in die *Galle* übertritt; 3. daß k-Strophanthin -γ bei der Inkubation mit Rattenkot (Bakterienflora?) zu k-Strophanthin -α (Cymarin) aufgespalten wird.

1. Versuche, durch Inkubation von Strophanthin mit Homogenaten und Extrakten aus den verschiedensten Organen eine Aufspaltung des Glykosids zu Cymarin nachzuweisen, verliefen negativ. Ein positives Resultat erhielten wir bei der Inkubation mit Ratten*kot*. Das schließt nicht aus, daß *in vivo* eine hydrolytische Spaltung des Glykosids auch in dem einen oder anderen Organ, z. B. dem Herzmuskel oder der Leber, durch organeigene Glucosidasen erfolgt. Unsere Untersuchungen geben aber hierfür keinerlei Anhaltspunkte, lassen es vielmehr möglich erscheinen, daß die von anderen Autoren (Stoll u. Renz) nach langdauernder Inkubation (48 Std) von Strophanthin mit Organpräparaten beobachtete geringfügige Spaltung durch Mikroorganismen, und nicht durch organeigene Hydrolasen bedingt war.

Bemerkenswert ist, daß im Gegensatz zur Säurehydrolyse der im Organismus erfolgende Abbau der Glykoside nur zur Abspaltung der Glucosereste, nicht hingegen des spezifischen Desoxyzuckers (Cymarose, Thevetose) führt. Es wäre vielleicht zu erwarten, daß Glykoside, deren Genine direkt mit Glucosemolekülen veräthert sind, z. B. Scillirosid (Scillirosidin-Glucose), bis zur Geninstufe gespalten werden.

2. Da es aus *zeitlichen* Gründen unwahrscheinlich ist, daß die schon 2 Std nach oraler Verabfolgung der Glykoside im *Kot* auftretenden

glucosefreien Spaltprodukte — Cymarin und Neriifolin — aus Glykosidanteilen entstehen, die auf dem Wege einer Darmpassage in den Dickdarm gelangen, so wäre zu fordern, daß Strophanthin und Thevetin in den *oberen* Darmabschnitten resorbiert, anschließend in den Dickdarm ausgeschieden und hier zu Cymarin bzw. Neriifolin aufgespalten werden. Das Auftreten unveränderten Strophanthins in der *Galle* nach oraler Zufuhr beweist, daß es als solches resorbiert werden kann; das Auftreten von *Cymarin* im *Kot* nicht nur nach oraler, sondern auch nach *subcutaner* Zufuhr von Strophanthin macht es wahrscheinlich, daß Strophanthin vom Blut aus in den Dickdarm ausgeschieden wird. Daß das dann hier gebildete Cymarin nicht nur mit dem Kot ausgeschieden, sondern zum Teil rückresorbiert werden kann, geht daraus hervor, daß es — *rectal* verabfolgt — im *Harn* erscheint.

Die schon in den oberen Darmabschnitten erfolgende *Resorption* von Strophanthin mit anschließender *Ausscheidung* in den Dickdarm und hier erfolgender Aufspaltung — schon nach 15 min langer Inkubation von Strophanthin mit Rattenkot ließ sich Cymarin nachweisen — würde das frühzeitige Auftreten von *Cymarin* im Kot und Harn erklären —, aber nicht ausschließen, daß der Resorption entgehende oder nach erfolgter Resorption mit der Galle wieder in den Dünndarm ausgeschiedene Anteile („entero-hepatischer Kreislauf") mit der Zeit auch durch *Darmpassage* in die tieferen, mit Bakterien besiedelten Darmabschnitte gelangen und hier nach hydrolytischer Spaltung als *Cymarin* zur Resorption gelangen. Die nach oraler Verabfolgung von k-Strophanthin bei Ratten auftretenden *pharmakologischen Wirkungen* wären dann nur insoweit *Strophanthin*wirkungen, als das im Dünndarm resorbierte und in die Leber gelangende Glykosid von dieser nicht wieder in die Galle ausgeschieden wird, sondern sie passiert —, während die *nicht* resorbierten oder die nach der Resorption vom *Blut* aus in den Dickdarm ausgeschiedenen Anteile gespalten und als *Cymarin* zur Wirkung gelangen. — Das würde dann auch erklären, weshalb das *Maximum* der Cymarinausscheidung in Harn und Kot und das Maximum der *kaliuretischen* Wirkung (Greeff) erst 6 Std nach der oralen Verabfolgung von Strophanthin erreicht wird.

3. Versuche, in denen wir zu Leberhomogenaten oder -extrakten *zugesetztes Strophanthin*, im Gegensatz zu zugesetztem *Cymarin*, erst nach tryptischer Verdauung des Eiweiß wiedergewinnen konnten, sprechen dafür, daß das nach oraler Gabe zur Resorption und in die Leber gelangende *Glykosid* diese nur zu einem kleinen Bruchteil passiert. Diese kleinen Mengen genügen nicht, um eine nachweisbare *Kaliurie* zu verursachen, sie genügen aber, um nach Ausscheidung in den Dickdarm, hydrolytischer Spaltung und Rückresorption mit Umgehung des Pfortaderkreislaufs als Cymarin im Harn und Kot schon 2 Std nach der

Strophanthingabe nachweisbar zu werden. Das *Maximum* der *Cymarinausscheidung* in Harn und Kot wird aber erst nach 6 Std erreicht. Diesem dürfte ebenso wie dem nach der gleichen Zeit auftretenden *Maximum* der *kaliuretischen Wirkung* die Resorption *größerer* Cymarinmengen aus dem Dickdarm zugrunde liegen, die aus dem im Verlauf von 4 Std durch Darmpassage in den Dickdarm gelangten Strophanthin hier entstehen.

Die Wiederausscheidung des aus dem Dünndarm in das Pfortaderblut resorbierten *Strophanthins* mit der *Galle* ist wohl mit die Ursache dafür, daß zur Erzielung gleichstarker kaliuretischer Wirkungen *Strophanthin* bei *oraler* Applikation 4—5mal höher dosiert werden muß als *Cymarin*, das die Leber offensichtlich leichter passiert und anscheinend nicht in die Galle ausgeschieden wird —, obwohl Glykosid und glucosefreies Spaltstück bei *subcutaner* Injektion praktisch gleichwirksam sind (Greeff).

4. Im Gegensatz zu Strophanthin mußte *Thevetin*, das als Digitoxigenin-glykosid, ähnlich wie Digitoxin *selbst*, bei oraler und subcutaner Applikation praktisch gleichwirksam ist, in den Versuchen Greeffs auch bei *subcutaner* Injektion 2 bis 3mal höher dosiert werden als das glucosefreie *Neriifolin*, um die gleiche Wirkung zu erzielen (Kaliurie); und auch bei *subcutaner* Injektion besaß die *Thevetin*wirkung — wiederum im Gegensatz zur *Strophanthin*wirkung und der Wirkung des Neriifolins — die gleiche *Latenz* (Maximum erst nach 6 Std) wie nach *oraler* Verabfolgung. *Thevetin* scheint demnach nicht als solches kaliuretisch zu wirken, sondern nur in dem Maße wirksam zu werden, als es im Organismus durch Abspaltung von 2 Glucosemolekülen in Neriifolin übergeht. Thevetin ist im Vergleich zu Strophanthin bei geringerer Wasserlöslichkeit leichter in Lipoiden löslich. Wenn die hydrolytische Aufspaltung des *Thevetins*, wie das für *Strophanthin* anscheinend zutrifft, auch nur im Dickdarm unter Mitwirkung von Mikroorganismen möglich sein sollte, was weitere Untersuchungen zeigen müßten, so würde das bedeuten, daß Thevetin — im Gegensatz zu Strophanthin — auch bei *parenteraler* Applikation nur insoweit zur Wirkung gelangt, als es nach Ausscheidung durch die *Galle* in den Darm oder hämatogener Ausscheidung in den Dickdarm hier zu *Neriifolin* abgebaut und als *Neriifolin* resorbiert wird.

5. Es ist anzunehmen, daß Strophanthin nicht nur zu glucosefreiem, pharmakologisch *wirksamen Cymarin*, sondern daneben auch zu pharmakologisch *unwirksamen* Produkten abgebaut wird, und daß auch dieser Abbau schnell erfolgt. Dafür spricht, daß nach Verabfolgung von Strophanthin neben Cymarin zwei weitere „*Metabolite*" in Harn und Kot auftreten. Die wahrscheinlich das *Genin*molekül angreifende, zu Unwirksamkeit führende Reaktion könnte sich schon im Dünndarm und in der Leber an den hier immer wieder anfallenden, einem „*enterohepatischen Kreislauf*" unterliegenden Glykosidanteilen abspielen und Ursache nicht nur dafür sein, daß Strophanthin *oral* viel weniger wirksam ist als bei *parenteraler* Injektion, sondern auch dafür, daß die *Wirkungsdauer* gering ist, obwohl der „enterohepatische Kreislauf", dem das Glykosid unterliegt, an sich eine große *Verweildauer* im Organismus gewährleistet.

Damit wird die Frage nahegelegt, welche *allgemein-pharmakologische* und *toxikologische* Bedeutung es haben könnte, wenn Stoffe, die *nicht* so leicht und schnell wie Strophanthin oder überhaupt nicht im Körper zu unwirksamen Produkten abgebaut und „entgiftet" und auch nur schwer durch Ausscheidung eliminiert werden, nach enteraler Resorption mit der Galle wieder in den Darm ausgeschieden werden, und immer nur kleinste Anteile aus dem „enterohepatischen Kreislauf" in die Zirkulation entweichen und zu den Organen gelangen. Handelt es sich um ein *Heilmittel*, so wäre eine langdauernde, zu Kumulation neigende, vielleicht sogar prophylaktisch verwertbare, *therapeutische* Wirkung zu erwarten, wie sie beispielsweise dem *Atebrin* und *Digitoxin* zukommt. Handelt es sich um ein *Gift*, so wäre einerseits nach *einmaliger* Aufnahme einer *größeren* Menge die Möglichkeit einer *chronischen Insultierung* bestimmter Organe durch die aus dem „enterohepatischen Kreislauf" dauernd in die Zirkulation entweichenden kleinen Mengen gegeben; andererseits bei *chronischer*, Tag für Tag erfolgender Zufuhr die Möglichkeit einer fast verlustlosen *Summation* auch kleinster Giftdosen. Hierdurch könnte der Eindruck einer Irreversibilität geringfügigster Insulte entstehen, wie z. B. bei manchen *cancerogenen Stoffen*, während es sich tatsächlich vielleicht um die auf dem Boden eines „enterohepatischen Kreislaufs" zustande kommende *substantielle* Addition kleinster Mengen eines Stoffes handelt, von dem wegen seiner geringen Eliminierbarkeit und seiner langen Verweildauer im Körper praktisch nichts verlorengeht. Es käme nicht nur zu einer — „allobiotischen" — Summation unterschwelliger *Wirkungen* und *Insulte*, sondern auch zu einer Addition unterschwelliger *Dosen*.

6. Der für die untersuchten, vom *Steran* sich ableitenden, *herzwirksamen Glykoside* geltende Mechanismus der *Resorption*, der *Wiederausscheidung*, der hydrolytischen *Aufspaltung* und der *Rückresorption* der glucosefreien Spaltstücke findet eine Parallele in dem von Straub u. Triendl vor 20 Jahren aufgeklärten Resorptions- und Wirkungsmechanismus der vom *Anthracen* sich ableitenden *darmwirksamen Glykoside*, z. B. der Sennesblätter. Auch diese werden zum Teil schon im *Dünndarm* resorbiert, anschließend in den *Dickdarm* wieder ausgeschieden und hier zu den glucosefreien *Emodinen* aufgespalten; aber auch die darmwirksamen Glykoside erreichen nach oraler Verabfolgung zum Teil durch *Darmpassage* den Dickdarm (Schmid).

Summary

In white rats, the breakdown of k-Strophanthin -γ and Thevetin has been studied, Metabolites were isolated, identified by paperchromatography and determined quantitatively from the faeces, the urine and the bile.

1. After oral or subcutaneous application of *k-Strophanthin* -γ, the urine and the faeces were found to contain *Cymarine* (k-Strophanthin-α), a metabolite with two molecules of glucose less than k-Strophanthin -γ. On the other hand, the bile contained not Cymarine, but k-Strophanthin -γ itself. The excretion of Cymarine into the urine and the faeces started after two hours and was maximal 4 to 6 hours after the ingestion of k-Strophanthin -γ.

2. After oral or subcutaneous application of *Thevetin*, the glucose-free metabolite Neriifolin was found in the urine and in the faeces.

3. No Cymarine was formed when k-Strophanthin γ was incubated with homogenates, extracts or acetone-dried powder of *liver*, *kidney*, *pancreas*, *intestinal wall*, *heart-* or *skeletal muscle* of rats, guinea-pigs, and oxen. However, substantial amounts of Cymarine were found after incubation of k-Strophanthin -γ with rat's *faeces*.

4. After *rectal* application of Cymarine, this substance was absorbed and excreted into the urine. This shows that the Cymarine formed by the faeces can be absorbed from the large intestine.

5. The following *metabolic pathways* are assumed for the cardiac glycosides investigated: a) Absorption from the *small* intestine and excretion into the *large* intestine. This would explain why the metabolites are found in the faeces and in the urine already two hours after oral application. b) Absorption from the small intestine and re-excretion of the unchanged substance with the *bile*. This *"entero-hepatic circulation"* may account for the protracted excretion of the metabolites in spite of the rapid absorption of the parent compounds. c) Part of the ingested glycosides may pass the small intestine without being absorbed and enter the large intestine, where they will be split off. This may explain why the maximal excretion of Cymarine and Neriifolin with the faeces and into the urine occurred 4 to 6 hours after the application of the glycosides, for this is about the time needed for the passage of the gastro-intestinal tract.

6. It is concluded that in rats the *pharmacological effects* caused by oral application of k-Strophanthin-γ or Thevetin are exerted not so much by the glycosides themselves, but rather by their glucose-free metabolites Cymarine and Neriifoline.

7. The similarity is pointed out between the absorption, excretion, destruction and re-absorption (delay in action when administered by mouth) of the *cardiac glycosides* and their metabolites on the one hand and the *anthracene cathartics* on the other.

Anmerkung bei der Korrektur. Inzwischen durchgeführte Versuche, eine Aufspaltung der Glykoside zu den glucosefreien Spaltstücken (Cymarin, Neriifolin) durch Inkubation bis zu 72 Std mit 10 aus Rattenkot gezüchteten Bakterienstämmen — einzeln und in Mischkultur — zu erzielen, führten zu keinem positiven Ergebnis (Coli, Staph. aureus, Enterokokken, Lactobac., B. faecalis alcaligenes, Escherichia coli, Proteus, vergrünende Streptokokken, Salmonella enteridis, Erreger der Gasödemgruppe). Für die Isolierung und Züchtung danken wir Herrn Prof. Herzberg, dem Direktor des hiesigen Hygiene-Instituts. Versuche mit Menschen-, Rinder-, Hunde- und Meerschweinchenkot hingegen verliefen positiv. Durch Inkubation mit Katzenkot ließ sich nur eine geringfügige Spaltung erreichen. Bei der Inkubation von Thevetin mit auf feuchtem Brot gewachsenen Schimmelpilzen entstanden gut nachweisbare Mengen Neriifolin. Das steht im Einklang

damit, daß Pilze aus der Gruppe der Hyphmomoycetales (Penicillin, Aspergillus) sowie Ascomyceten (Claviceps purpurea) auch aus Digilanid A und Scillirosid die Glucosemoleküle abzuspalten vermögen (Stoll, Renz u. Brack). Ob aber die bei der Inkubation mit Kot erfolgende hydrolytische Spaltung der Glykoside durch etwa im Kot vorkommende Pilze verursacht ist, müßten weitere Untersuchungen klären.

Literatur

Goldschmidt, St., F. Helmreich u. B. Körber: Zeitschr. physiol. Chem. **290**, 106 (1952).
Greeff, K.: Naunyn-Schmiedeberg's Arch. exp. Path. Pharmak. **233**, 468 (1958).
Haack, E., F. Kaiser, M. Gube u. H. Spingler: Arzneimittel-Forsch. **6**, 176 (1956).
Jacobs, W., and A. Hoffmann: J. biol. Chem. **67**, 609 (1926).
Lendle, L.: Heffters Handb. der exp. Phamarkol., Erg. Werk **1**, 11 (1935).
Neumann, W.: Naunyn-Schmiedeberg's Arch. exp. Path. Pharm. **208**, 46, 87 (1949).
Schmid, W.: Arzneimittel-Forsch. **2**, 6 (1952).
Stoll, A., u. J. Renz: Helv. chim. Acta **34**, 782 (1951).
Stoll, A., J. Renz u. A. Brack: Helv. chim. Acta **34**, 397 (1951).
Straub, W., u. E. Triendl: Naunyn-Schmiedeberg's Arch. exp. Path. Pharm. **185**, 1 (1937).
Tschesche, R., G. Grimmer u. F. Seehofer: Chem. Ber. **86**, 1235 (1953).
Weese, H.: „Digitalis". Leipzig: G. Thieme 1936.

Professor Dr. med. P. Holz, Pharmakologisches Institut der Universität Frankfurt a. M., Ludwig-Rehn-Str. 14

Arch. exper. Path. u. Pharmakol., Bd. 233, S. 409—421 (1958)

Aus dem Pharmakologischen Institut der Freien Universität Berlin

Stoffwechselstörungen bei Neurospora crassa nach Einwirkung der wachstumshemmenden Hexachlorcyclohexane

Von

HANS HELGE

Mit 3 Textabbildungen

(Eingegangen am 30. Dezember 1957)

Unter den als Kontaktinsecticide bekannt gewordenen Hexachlorcyclohexanen zeichnet sich das γ-Isomere durch besonders hohe Wirksamkeit aus. Sie wurde zunächst durch einen kompetitiven Antagonismus zwischen Gammexan und m-Inosit erklärt, der zu der Verdrängung des wichtigen Wuchsstoffes führen sollte (SLADE 1945). Die endgültige Aufklärung der Konfiguration aller HCH-Isomeren (VAN VLOTEN u. Mitarb. 1948; BIJVOET 1948; BASTIANSEN, ELLEFSEN u. HASSEL 1948, 1949, 1950; OIWA u. Mitarb. 1952; RIEMSCHNEIDER 1950, 1951, 1952; ORLOFF u. Mitarb. 1953, 1954) hat jedoch ergeben, daß die Stellung der OH-Gruppen im m-Inosit nicht der sterischen Anordnung der Chlor-Atome des Gammexans, sondern der des δ-HCH entspricht. Es ist daher sehr unwahrscheinlich, daß die stärkere insekticide Wirkung des γ-Isomeren auf einer Verdrängung des Inosits und der dadurch möglichen Ausschaltung aus dem Stoffwechsel beruht.

Es existieren zwar Untersuchungen über einen Antagonismus von Gammexan und m-Inosit (KIRKWOOD u. PHILIPPS 1946; BUSTON u. Mitarb. 1946; LANE u. WILLIAMS 1948). Doch geht aus zahlreichen anderen Untersuchungen hervor, daß es sich dabei nicht um einen kompetitiven Antagonismus strukturisomerer Verbindungen handeln kann (SCHOPFER u. Mitarb. 1947, 1948a, 1948b, 1951, 1953, 1954; POUSSEL, H. 1947, 1948, 1949; CHARGAFF u. Mitarb. 1948; SODERHJELM u. ZETTERBERG 1948; D'AMATO 1949; FULLER u. Mitarb. 1950; TIRUNARAYANAN u. SARMA 1953). Auch die interessanten Angaben über die Hemmung verschiedener Fermente durch HCH-Präparate (SCHNEIDER u. LENDLE 1950; DEMUTH u. LENDLE 1951; UTJINO u. Mitarb. 1952; KELLER 1953), die manche Störung im intermediären Stoffwechsel erklären, erlauben noch keine endgültigen Aussagen über die Spezifität der Effekte.

Viele Versuche haben überdies ergeben, daß δ-Hexachlorcyclohexan (Dexan) wirksamer ist als Gammexan (CHAIX u. Mitarb. 1948; FROMAGEOT u. Mitarb. 1948a, 1948b, 1948c, 1950; RIEMSCHNEIDER u. GERISCHER 1948, 1951; MC. NAMARRA u. KROP 1948, 1949). Seine Wirkung kann ebenso wie die von Gammexan durch Inosit oder andere Substanzen antagonistisch beeinflußt werden (SCHOPFER 1954). Zu den Mikroorganismen, die gegen Dexan empfindlicher sind als gegen Gammexan, gehört auch Neurospora crassa (SIMON 1955).

Da in vielen Untersuchungen anderer Autoren lediglich der Einfluß von Hexachlorcyclohexan auf das Wachstum bestimmt wurde, sollte in eigenen Versuchen der Einfluß von Dexan auf Atmung, oxydative Assimilation und Wachstum verglichen werden. Dabei hofften wir, aus einer Substratabhängigkeit der Wirkung vielleicht auf die Art der Stoffwechselhemmung schließen zu können.

Methodik. Verwendung fand der auf einem von Ryan (1950) angegebenen Minimal- bzw. Komplettmedium gezüchtete Wildstamm 7A von Neurospora crassa. Conidien von 7 Tage alten Schrägagarkulturen auf Komplettmedium wurden durch Abspülen geerntet, durch sterile Wattefilter von anhaftenden Mycelresten getrennt, in m/15 Phosphatpuffer mehrmals gewaschen und in einer Konzentration von 0,5—1,0 · 10^8 Conidien/Milliliter in Minimalmedium suspendiert. 100 ml dieser Suspension wurden in 500 ml Erlenmeyer-Kolben 12—14 Std bei 20° C im Schüttelapparat bei einer Frequenz von 90—100/min inkubiert. Die nach dieser Zeit zu 95% ausgekeimten Conidien stellten ein für Atmungsversuche gut geeignetes junges Pilzmycel. Eine hohe Atmung und ein Mangel an störenden Reserveprodukten war ebenso wünschenswert wie die Tatsache, daß die noch sehr kurzen Pilzhyphen kein zusammenhängendes Geflecht bildeten und sich gut pipettieren ließen. In allen Versuchen wurden Aufschwemmungen derartiger Pilzfäden in NaCl-Lösung, Phosphatpuffer oder Minimalmedium verwendet. Nach Abfiltration der Suspensionsflüssigkeit durch ein Bakterienfilter ließ sich die trotz der kurzen Mycelfäden gut zusammenhängende Pilzmatte leicht abschaben, zusammenrollen, trocknen und auf einer Torsionswaage wiegen.

Die Atmung wurde in der von Warburg angegebenen Apparatur gemessen, dabei erfolgte die Bestimmung des QO_2-Wertes nach der direkten, die Berechnung des respiratorischen Quotienten nach der indirekten Methode. Maß der Assimilation war die Gewichtszunahme während des Versuches. Eine Korrektur der gemessenen Werte der Substratoxydation durch Abzug der endogenen Atmung erfolgte nicht, da die Streuung nach Abzug der endogenen QO_2-Werte größer war als ohne diese Korrektur.

Die endogene Atmung mußte gedrosselt werden, um den durch sie bedingten Fehler möglichst klein zu halten. Wir wählten eine Verarmungszeit von 2 Std bei 30° C, weil die endogene Atmung dann schon auf etwa die Hälfte abgesunken war, ohne daß eine Zellschädigung festgestellt werden konnte.

Dextrose wurde nach Hagedorn-Jensen, Essigsäure durch Destillation mit Citronensäure nach Herriott bestimmt; qualitative Proben auf Äthylalkohol, Acetaldehyd, Essig-, Milch-, Brenztrauben- sowie Citronensäure erfolgten nach Angaben von Bauer.

Die Messung des Wachstums erfolgte im Röhrchentest (Ryan 1943; Simon 1955).

Wir verwandten für unsere Versuche das Dexan, weil es bei Neurospora crassa eine stärkere Wirkung entfaltet als die übrigen HCH-Isomeren. Alle HCH-Präparate sind sehr schwer wasserlöslich, und auch das am besten lösliche Dexan liegt bei den von uns verwendeten Konzentrationen (Höchstkonzentration 2 · 10^{-4} molar) teilweise schon in übersättigter Lösung vor und hat die Neigung auszufallen. Um den Einfluß eines nicht indifferenten Lösungsmittels auszuschalten, gaben wir diesem in Wasser gelösten Dexan jedoch den Vorzug gegenüber den Lösungen in Aceton oder Alkohol. Das Dexan wurde schon vor Versuchsbeginn in dem zur Suspension der Pilze dienenden Medium gelöst. Lediglich in einigen Versuchen, in denen Glycerin als Substrat Verwendung fand, wurde das Dexan in diesem gelöst und erst mit dem Glycerin zusammen aus dem Seitenarm des Warburg-Troges in den Hauptraum

mit der Pilzsuspension eingekippt. Außer Glycerin dienten Glucose, Alkohol und Essigsäure als Substrat. Diese Substanzen, die von Neurospora crassa gut verwertet werden können, wurden teilweise in begrenzter Menge von 0,2—1,0 mg pro Ansatz, teilweise auch im Überschuß in einer Endkonzentration zwischen 0,2 und 1,0% angeboten. Alle angebotenen Substrate werden von Neurospora crassa, auch von ruhenden Zellsuspensionen, nicht nur oxydiert, sondern zum großen Teil auch gleichzeitig assimiliert. Dabei stehen Oxydation und Assimilation jeweils in einem bestimmten Verhältnis zueinander (Helge 1956). Als Maß der Kopplung von Oxydation und Assimilation diente der assimilatorische Quotient (A.Q.). Dieser läßt sich aus dem Sauerstoffverbrauch (Kubikmillimeter) und der Zunahme an intracellulärem Assimilationsprodukt (Milligramm Trockengewicht × 10) einfach errechnen und ist unter gleichen Versuchsbedingungen für jedes Substrat konstant. Ein Anstieg des assimilatorischen Quotienten ist Ausdruck einer schlechteren Substratnutzung. Wird eine Substanz zwar noch verbrannt, aber gar nicht mehr assimiliert, so ist ihr A.Q. = ∞. Um die durch ein Stoffwechselgift bewirkte Verwertungsstörung eines Substrates besser zu erfassen, wurden Oxydation und Assimilation nebeneinander am gleichen Untersuchungsmaterial gemessen.

Die Dexanwirkung ist von mehreren Faktoren abhängig. Unter sonst gleichen Bedingungen wird die Atmungshemmung von der Dichte der Pilzsuspension bestimmt. Je mehr Zellen in der gleichen Flüssigkeitsmenge mit einer bestimmten Dexankonzentration aufgeschwemmt sind, desto geringer ist die Schädigung der einzelnen Zelle. In isotonischer Kochsalzlösung aufgeschwemmte Zellen zeigen diese Abhängigkeit deutlicher als Zellsuspensionen in Phosphatlösung (Tab. 1).

Tab. 1. *Beispiel für die Abhängigkeit der Dexanwirkung von der Pilzkonzentration*

Pilzmenge	Kontrolle		10^{-4} molar Dexan			
mg/2 ml	QO_2	Ges. O_2	QO_2	Prozent Hemmung	Ges. O_2	Prozent Hemmung
1,0	62,5	82,5	29,4	53,0	37,4	54,7
2,0	56,8	157,5	43,3	23,8	114,6	27,3

Pilzmaterial: Ausgekeimte, an Reservematerial verarmte Conidien. Suspensionsflüssigkeit: 0,85% NaCl-Lösung mit 2% Glycerin. Dexan in Glycerin gelöst und bei Versuchsbeginn aus dem Seitenarm in den Warburg-Trog eingekippt. Pilzmenge zu Versuchsbeginn: 1,0 bzw. 2,0 mg Trockengewicht/Gefäß. Versuchsdauer: 1,5 Std. Beispiel für einen von 5 Versuchen: Mittelwerte aus Doppelansätzen. Versuchstemperatur 30° C.

Setzt man derselben Dexanlösung mehrmals hintereinander frisches Zellmaterial zu, so nimmt die Dexanwirkung langsam ab. Das Dexan scheint an den Pilzen zu haften und mit diesen aus der Lösung entfernt zu werden. Mehrmaliges Auswaschen der in Dexanlösung suspendierten Zellen führt zu einem Wiederanstieg der abgesunkenen Oxydationsrate auf fast normale Werte. Diese Beobachtungen weisen auf die Bedeutung reversibler Absorptionsvorgänge zwischen Zelloberfläche und Dexan hin. Dexan verhält sich in dieser Hinsicht demnach wie viele andere Stoffe.

Die Abhängigkeit der Dexanwirkung von der Konzentration verdeutlicht ein Vergleich von Oxydation und Assimilation. Beide Prozesse werden unabhängig vom Substrat verschieden stark betroffen. Geringe Konzentrationen hemmen nur die Assimilation, höhere beeinträchtigen auch die Atmung. Dabei ist die Hemmung der Oxydation in stärkerem Maße vom Substrat abhängig als die der Assimilation (Tab. 2).

Tabelle 2. *Beispiel für die Abhängigkeit der Atmungshemmung von der Kohlenstoffquelle* Vergleich der Dexanwirkung auf die Oxydation verschiedener Substrate bei vollständiger Hemmung der Assimilation

Substrat	10^{-4} molar Dexan Prozent Hemmung	
	Oxydation	Assimilation
Dextrose	12,0 (0—12)	100 (70—100)
Glycerin	24,7 (15—25)	100 (60—100)
Alkohol	31,3 (5—32)	100 (50—100)
Acetat	43,3 (15—45)	100 (85—100)

Pilzmaterial: Ausgekeimte, an Reservematerial verarmte Conidien, suspendiert in m/15 Phosphat-Lösung. Substrat: Dextrose, Glycerin und Alkohol jeweils 0,5%, Alkohol 0,2%. Pilzmenge zu Versuchsbeginn: 1,2 mg Trockengewicht/Gefäß. Versuchszeit 2 Std. Beispiel für eine Versuchsreihe von 8 Versuchen mit Doppelansätzen. Die eingeklammerten Zahlen geben die niedrigsten und höchsten Werte der anderen Versuche an. Versuchstemperatur 30° C.

Dexankonzentrationen über 10^{-4} molar bewirken fast immer eine mehr oder minder starke, irreversible Zellschädigung, die sich in einer Abnahme der Überlebensrate der Zellen äußert. Es ist verständlich, daß unter diesen Versuchsbedingungen auch die Atmung stärker absinkt. Dabei ist in Kochsalzlösung suspendiertes Mycel empfindlicher als solches in Phosphatlösung.

Die endogene Atmung wird durch Konzentrationen bis 10^{-4} molar manchmal gering gesteigert, meist aber gehemmt. Hin und wieder kommt es auch zu einer Steigerung der Substratoxydation durch niedrige Dexankonzentrationen. Sie ist aber nicht regelmäßig zu erzielen und beträgt in keinem Falle mehr als 15% der Kontrolle. Ein Vergleich der Atmung von Kontrollen und Pilzsuspensionen in 10^{-5} bis 10^{-4} molaren Dexanlösungen läßt erkennen, daß die Oxydation im allgemeinen nur wenig beeinträchtigt wird, während die oxydative Assimilation schon deutlich gehemmt ist. Einige Versuche zeigen sogar, daß assimilatorische Prozesse vollständig blockiert sein können, ohne daß die QO_2-Werte absinken. Lediglich zu Anfang ist in solchen Fällen eine geringe, vorübergehende Hemmung der Atmung durch Dexan festzustellen. Im Verlaufe des Versuches kann die Atmungsrate sogar etwas über die für die Kontrolle gemessene ansteigen (Abb. 1).

Man kann die Assimilationshemmung daran erkennen, daß für eine gleiche Substratmenge bedeutend mehr Sauerstoff verbraucht wird. Wenn kein Substrat mehr für Speicherung oder Assimilation verwendet wird, muß dieser recht erhebliche Substratteil ja entweder als nicht weiter verwertbares Intermediärprodukt im Suspensionsmedium angereichert oder aber zusätzlich oxydiert werden. Im letzteren Falle müßte sich die verbrauchte Sauerstoffmenge dem für vollständige Oxydation des Substrates zu Kohlendioxyd und Wasser berechneten Wert nähern. Unter dem Einfluß von Dexan trifft dies auch für die Oxydation aller Substrate zu (Abb. 2).

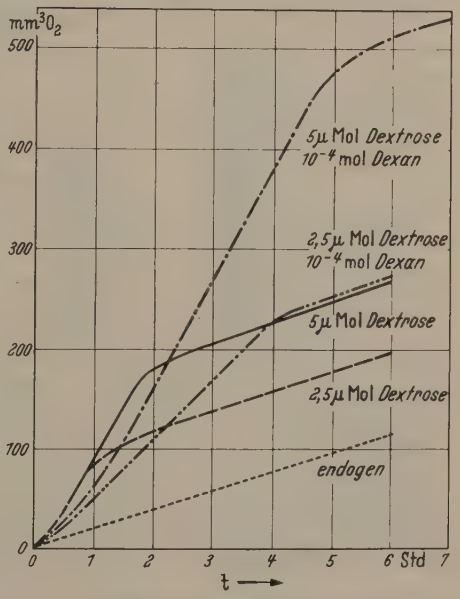


Abb. 1. *Entkopplung von Oxydation und Assimilation unter dem Einfluß von Dexan* Pilzmaterial: Ausgekeimte, an Reservematerial verarmte, an Dextrose adaptierte Conidien. Suspensionsflüssigkeit: m/15 Phosphatlösung, teilweise 10^{-4} molar Dexan. Begrenztes Dextroseangebot. Pilzmenge zu Beginn des Versuches 1, 1 mg Trockengewicht/Gefäß. Der Knick in der Atmungskurve gibt den Zeitpunkt der Substraterschöpfung an. Versuchstemperatur: 30° C

Die gleiche Substratmenge, die unter normalen Bedingungen in 1—2 Std verbraucht, d. h. oxydiert und assimiliert wird, kann selbst bei gleicher Oxydationsrate nur dann vollständig oxydiert werden, wenn die Versuchszeit bedeutend verlängert wird. Sinkt die Atmung jedoch ab, und bei vollständiger Assimilationshemmung ist das häufig der Fall, so muß man die Versuche sehr lange ausdehnen, um den Zeitpunkt der Substraterschöpfung genau bestimmen zu können. Dies ist aber nicht immer möglich. Bei gleicher Versuchsdauer erlaubt ein Vergleich der assimilatorischen Quotienten von Kontrolle und Ansatz mit Dexan jedoch eine Beurteilung der Frage, ob und inwieweit die Zelle die Fähigkeit zur oxydativen Assimilation verloren hat. Eine derartige Störung äußert sich in einem deutlichen Anstieg des Quotienten (Tab. 3).

Die Bestimmung dieses Wertes macht es auch überflüssig, in jedem Fall Oxydations- und Assimilationsrate zu berücksichtigen. Gesamtsauerstoffverbrauch und Trockengewichtsänderung bei Versuchsende werden damit zum Maß für die Nutzung der bei der Oxydation frei gewordenen Energie. Ein Vergleich dieser Größen ist auch dann noch möglich, wenn es bei unvollständiger Blockierung der Assimilation schon zu einer Hemmung der Atmung gekommen ist.

Während die Messungen für Parallelansätze nur ganz geringe Schwankungen ergeben, unterscheiden sich die Ergebnisse mit verschiedenem Ausgangsmaterial und verschiedenen Lösungen teilweise

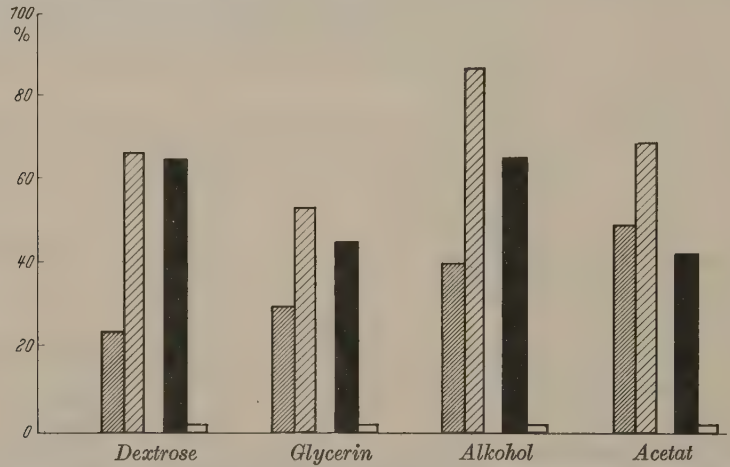


Abb. 2. *Oxydation und Assimilation verschiedener Substrate in Abhängigkeit von der Dexanwirkung.* Pilzmaterial: Ausgekeimte, adaptierte und verarmte Conidien. Suspensionsflüssigkeit: m/15 Phosphatlösung, teilweise mit Dexan. Als Substrat Dextrose, Glycerin, Alkohol oder Acetat in einer Konzentration von 0,2 bzw. 0,5%. Pilzmenge zu Versuchsbeginn: 1—2 mg Trockengewicht/Gefäß-Messung von Sauerstoffverbrauch und Trockengewichtsänderung. Versuchsdauer 2—4 Std. Versuchstemperatur 30° C. ▨ Sauerstoffverbrauch der Kontrolle für eine bestimmte Substratmenge. ▨ Sauerstoffverbrauch für eine gleiche Substratmenge unter Dexaneinfluß. ■ Anteil Substratkohlenstoff, der von den Kontrollen assimiliert wird. □ vollständige Assimilationshemmung unter dem Einfluß von Dexan. 100%: theoretischer Wert für vollständige Oxydation des Substrates zu CO_2 und H_2O bzw. für vollständigen Einbau des Substratkohlenstoffs in ein Assimilationsprodukt der Zusammensetzung Cn (H_2O)n

Tabelle 3. *Einfluß von Dexan auf die Verwertung verschiedener Substrate*

Substrat	Kontrolle			Dexan 10^{-4} molar		
	QO_2	A.Q.	R.Q.	QO_2	A.Q.	R.Q.
Dextrose	101,6 ± 8,6	25,5 ± 1,9	1,0	98,1 ± 14,3	100—∞	1,0
Glycerin	87,7 ± 8,1	71,6 ± 11,5	—	69,9 ± 12,5	100—∞	—
Alkohol	112,5 ± 7,7	81,2 ± 7,9	0,45	92,8 ± 20,8	250—∞	0,66
Acetat	231,1 ± 17,1	99,0 ± 18,9	1,0	160,4 ± 30,6	350—∞	1,0

Pilzmaterial: Ausgekeimte, adaptierte und verarmte Conidien. Suspensionsflüssigkeit: m/15 Phosphatlösung mit Dextrose (0,5%). Glycerin (0,5%), Alkohol (0,2%) oder Acetat (0,5%). Pilzmenge zu Versuchsbeginn: 0,8—2 mg Trockengewicht/Gefäß. Versuchsdauer 2—4 Std. Zusammenstellung von Werten aus mehreren Versuchen, in jeder Reihe mindestens 5, höchstens 35 Einzelergebnisse. Berechnung der Mittelwerte und Streuung für die Kontrollen, Angabe der Grenzwerte für die Dexanversuche. Versuchstemperatur 30° C.

erheblich voneinander. Empfindlichkeitsunterschiede der von Versuch zu Versuch zwischen 0,9—1,4 mg pro Gefäß schwankenden Pilzmenge sowie eine verschiedene Wirksamkeit der teilweise doch übersättigten

HCH-Lösungen und wechselnde Substratkonzentrationen mögen diese Differenzen erklären. Die substratbedingten Besonderheiten der Dexanwirkung sollen im folgenden kurz aufgezählt werden.

Dextrose

Die Oxydation von Glucose wird durch Dexan weniger beeinträchtigt als die der anderen Substanzen. Bei gleicher Dexankonzentration ist die Assimilation umso stärker gehemmt, je weniger Dextrose im Suspensionsmedium angeboten wird. Wird von einer begrenzten Glucosemenge schon nichts mehr assimiliert, so ist unter sonst gleichen Bedingungen bei Dextroseüberschuß noch eine Synthese von Reservematerial zu beobachten (Tab. 4). Hohe Glucosekonzentrationen entfalten offenbar eine Schutzwirkung gegen Dexan.

Tabelle 4. *Abhängigkeit der Dexanwirkung von der Glucosekonzentration*

	Dextrosemenge µMol	QO_2	Ges. O_2 mm^3	Assimilation		Prozent Hemmung	
				mg	A.Q.	Oxyd.	Assim.
ohne Dexan	2,5	100,7	89,9	0,35	25,7		
	5,0	105,5	174,7	0,65	26,8		
	7,5	107,6	253,6	0,95	26,7		
	10,0	105,5	322,5	1,10	29,3		
	50,0	108,0	212,2	0,75	28,3		
Dexan 10^{-4} mol.	2,5	65,6	200,4	—	∞	34	100
	5,0	98,6	411,0	0,05	411,0	5	92
	7,5	109,0	366,8	0,15	244,5	—	86
	10,0	108,9	372,5	0,20	136,3	—	80
	50,0	96,6	161,0	0,30	53,7	6	60

Pilzmaterial: Ausgekeimte, an Reservematerial verarmte Conidien. Suspensionsflüssigkeit: m/15 Phosphatlösung, teilweise 10^{-4} molar Dexan, verschiedene Glucosekonzentrationen. Pilzmenge zu Versuchsbeginn: 1,2 mg Trockengewicht. Sauerstoffverbrauch: Bei den geringen Glucosemengen ist der Sauerstoffverbrauch für den Zeitpunkt berechnet, zu dem das Auftreten eines Knicks in der Atmungskurve anzeigt, daß alles verfügbare Substrat verwertet worden ist. Für die übrigen Ansätze gilt der Sauerstoffverbrauch bei Versuchsende. Beispiel für einen von 5 Versuchen, in denen jedoch jeweils nur 2 oder 3 verschiedene Dextrosekonzentrationen geprüft wurden. Mittelwerte aus Doppel-Ansätzen. Versuchstemperatur 30° C.

Eine Entkopplung von Oxydation und Assimilation müßte man demnach am besten mit kleinen Dexankonzentrationen und geringen Glucosemengen nachweisen können. Tatsächlich läßt sich auch nur auf diese Weise eine vollständige Hemmung der Assimilation ohne gleichzeitige Beeinträchtigung der Atmung erzielen (Abb. 1, Tab. 4). Der bei vollständiger Ausschaltung der Assimilation durch Dexan für eine bestimmte Glucosemenge gemessene Sauerstoffverbrauch entspricht jedoch nicht ganz der Menge, die man bei vollständiger Oxydation der

Dextrose zu Kohlendioxyd und Wasser erwartet hätte (Abb. 2). Ähnlich wie auch in den Kontrollversuchen zeigen die Ergebnisse mit Dexan, daß der Verbrauch einer bestimmten Glucosemenge nicht durch Oxydation und Assimilation allein zu erklären ist. Die Bildung anderer, von uns nicht näher bestimmter Zwischenprodukte spielt dabei wohl eine Rolle. Während im Kontrollversuch nur der Verlust von 10% der angebotenen und verbrauchten Glucose nicht durch Oxydation und Assimilation erklärt werden kann, verschwinden bei vollständiger Assimilationshemmung durch Dexan sogar 30—35% der angebotenen Glucose, ohne daß dafür Sauerstoff verbraucht wird. Trotz Entkopplung von Oxydation und Assimilation beträgt der gemessene Sauerstoffverbrauch in keinem Versuch mehr als 70% der für eine vollständige Verbrennung berechneten Menge.

Der respiratorische Quotient für Dextrose wird durch Dexan nicht beeinflußt, der assimilatorische Quotient steigt in allen Versuchen mit zunehmender Dexankonzentration deutlich an.

Glycerin

Die Verwertung von Glycerin wird durch Dexan in ähnlicher Weise gestört. Eine Atmungshemmung erfolgt schon durch etwas geringere Konzentrationen als bei Dextrose, die Assimilation ist gleich stark beeinträchtigt. Die Entkoppelung assimilatorischer und oxydativer Reaktionen äußert sich hier wie dort in vermehrtem Sauerstoffverbrauch für eine begrenzte Substratmenge und in einem Anstieg des assimilatorischen Quotienten (Tab. 3, Abb. 2).

Äthylalkohol

Für die Oxydation von Alkohol gilt das Gleiche wie für Glycerin. Die Assimilation von Alkohol ist ebenfalls bedeutend empfindlicher und durch geringere Konzentrationen zu hemmen als die Oxydation. Der im Kontrollversuch gemessene respiratorische Quotient von etwa 0,45 steigt unter dem Einfluß von Dexan bis auf 0,66 an. Dieser Wert entspricht einem respiratorischen Quotienten, wie man ihn bei vollständiger Oxydation des Alkohols erwarten müßte. Damit wird die Annahme bestätigt, daß eine hochgradige bis vollständige Blockierung der Assimilation die Verbrennung des sonst assimilierten Substratanteiles möglich macht (Abb. 2).

Essigsäure

Die Acetatverwertung wird am deutlichsten gehemmt. Neben einer Störung der Assimilation fällt eine recht erhebliche Hemmung der Oxydation auf. Außerdem ist die in allen Kontrollversuchen beobachtete Adaptation verzögert, durch höhere Dexankonzentrationen wird sie sogar ganz unterdrückt. Die Oxydationshemmung ist hier daher stärker ausgeprägt als bei Verwendung anderer Substanzen. Der respiratorische

Quotient von 1,0 ändert sich unter dem Einfluß von Dexan nicht, der Gesamtsauerstoffverbrauch für eine begrenzte Substratmenge nähert sich jedoch dem für vollständige Oxydation berechneten Wert, und der assimilatorische Quotient steigt an (Tab. 3, Abb. 2).

Wie im Kontrollversuch war auch nach Dexaneinwirkung für kein Substrat eine feste Relation zwischen Oxydations- bzw. Assimilationsgröße und Phosphataufnahme festzustellen. Damit entfällt die Möglichkeit, an intakten Zellen von Neurospora crassa eine Entkopplung von Oxydation und Phosphataufnahme nachzuweisen, wie es beispielsweise Hotchkiss (1944) und Yoshida (1952, 1953) an Bakterien und Hefe gelang.

Niedrige Dexankonzentrationen, die bei ruhenden Zellen ohne eine wesentliche Störung der Substratverbrennung eine vollständige Hemmung der oxydativen Assimilation bewirken, vereiteln auf festem Nährboden und in flüssigem Minimalmedium auch die Synthese von Zelleiweiß und damit das Wachstum. Dabei wird das Ausmaß dieser Hemmung von der dem Nährboden zugesetzten Kohlenstoff- und Energiequelle mitbestimmt (Tab. 5).

Tabelle 5. *Einfluß von Dexan auf das Wachstum von Neurospora crassa* Abhängigkeit der Wachstumshemmung von der Energiequelle

Substrat	Prozent Hemmung				
	10^{-5}	$2 \cdot 10^{-5}$	$3{,}5 \cdot 10^{-5}$	$7 \cdot 10^{-5}$	10^{-4}
	Dexan				
Dextrose	0—5	10—15	30—35	45—55	100
Glycerin	0—5	15—25	50—55	65—70	100
Alkohol	25—35	45—55	55—60	70—75	100
Acetat	45—60	70—80	90—100		

Messung des Wachstums im Röhrchentest: Bestimmung der Wachstumsgeschwindigkeit in Millimeter/Stunde in einem mit 2% Agar-Minimalnährboden beschickten Röhrchen. Verschiedene Kohlenstoffquellen im Minimalmedium. Beimpfung an einem Röhrchenende mit frischen Conidien. Verschiedene Dexankonzentrationen. Versuchsdauer mehrere Tage. Die Hemmung des Wachstums ist zu Versuchsbeginn am stärksten ausgeprägt und läßt dann etwas nach. Bei ganz geringen Dexankonzentrationen wird am ersten oder zweiten Tag sogar die Geschwindigkeit der Kontrollen erreicht. Hohe Dosen bewirken jedoch eine mit der Versuchsdauer zunehmende Hemmung. In dem Zwischenbereich bleibt die Wachstumsrate nach der relativ kurzen Zeit des logarithmischen Anstiegs konstant. Ein Vergleich mit der Kontrolle erlaubt hier die Berechnung und Angabe der Hemmung in Prozent des Kontrollwertes. Es sind die Grenzen des Streubereichs aus 3 Versuchen mit 3fachen Ansätzen angegeben. Versuchstemperatur 30° C.

Das Auskeimen von Conidien wird erst durch höhere Dexankonzentrationen verhindert, ein Zeichen dafür, daß Conidien weniger empfindlich sind als junges Mycel (Abb. 3).

Parallelversuche mit Gammexan sprechen für die Ansicht, daß es ähnlich wirken kann wie Dexan. In gleicher Konzentration ist die Hemmung assimilatorischer Prozesse durch Gammexan allerdings weniger instruktiv.

Eine antagonistische Wirkung von m-Inosit konnte in unseren Versuchen nicht festgestellt werden.

Die Ergebnisse der Versuche mit Zellsuspensionen von Neurospora crassa zeigen, daß Dexan in geeigneter Konzentration die oxydative Assimilation und die Synthese von Zelleiweiß verhindern kann, ohne die Atmung zu beeinträchtigen. Eine solche Entkopplung von Oxydation und Assimilation kann man auch mit anderen Stoffwechselgiften erzielen. Erstmals wurde eine derartige Wirkung in Versuchen mit 2,4-Dinitrophenol und Azid beobachtet, und zwar zu einer Zeit, als man noch nicht wußte, daß diese Substanzen die Bildung energiereichen Phosphats hemmen und dadurch den Energiehaushalt der Zelle stören. Aus dieser Zeit stammt auch der Begriff der Entkopplung (Clifton 1946, 1952). Dexan scheint wie die erwähnten Verbindungen in den Ablauf von Reaktionen einzugreifen, die für die Energieübertragung von Bedeutung sind.

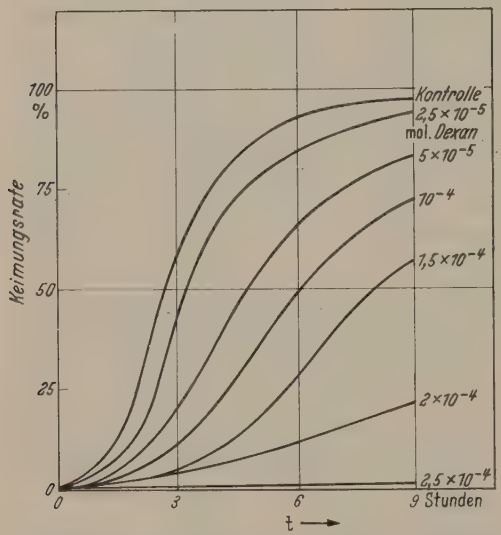


Abb. 3. *Einfluß von Dexan auf die Keimung von Conidien.* 7 Tage alte, auf Komplettagar gezüchtete Conidien, mehrmals in m/15 Phosphatlösung gewaschen und in Dextrose-Minimalmedium suspendiert. Versuchstemperatur 30° C

Die Folge der Entkopplung von Oxydation und Phosphorylierung ist eine Hemmung aller endergonischen Reaktionen und damit eine Störung mannigfacher Zellfunktionen. Dazu rechnet die in unseren Versuchen gemessene oxydative Assimilation ebenso wie die Synthese von Zelleiweiß während der Adaption oder des Wachstums (Spiegelmann 1952). Dexan hemmt alle diese Reaktionen stärker als die Atmung und gleicht in seiner Wirkung damit der des Dinitrophenols. Diese Analogie berechtigt zu der Annahme, daß auch Dexan eine allen Assimilations- und Syntheseprozessen gemeinsame Reaktion hemmt, z. B. die Bildung energiereichen Phosphats.

Eine Zelle kann sicher ganz verschiedene Eingriffe in den Stoffwechsel in gleicher Weise mit einer Entkopplung von Atmung und Phosphorylierung beantworten. Dies geht auch aus Versuchen mit isolierten Mitochondrien aus Warmblüterzellen hervor, bei denen zahlreiche Pharmaka mit sehr verschiedenem Wirkungscharakter ähnliche Reaktionen auslösen (Brody 1955; Chance u. Williams 1956), so daß diese Untersuchungen noch keine befriedigende Antwort auf die Frage nach der Spezifität der erzielten Effekte geben.

Die durch Dexan bewirkte Entkopplung von Oxydation und Assimilation ist Ausdruck einer schweren Störung im Energiehaushalt der Zelle. Sie genügt zur Erklärung der wachstumshemmenden Wirkung der Hexachlorcyclohexane bei Neurospora crassa und anderen Mikroorganismen.

Summary

The influence of δ-Hexachlorohexane (Dexane) upon respiration and assimilation in Neurospora crassa (wild-type 7a) has been studied. Coupling of oxidation and assimilation has been expressed by an "assimilating quotient" which means

$$\frac{\text{consumed } O_2 \text{ cmm}}{\text{rise of mycel weight mg} \times 10.}$$

In general 10^{-5} to 10^{-4} mol do not change oxidation whereas oxidative assimilation is remarkably diminished. The inhibition of oxidation depends more on the kind of substrate than that of assimilation.

The substrates glucose, glycerol, ethanol and acetat have been used. Assimilation under normal oxidation is most sensitive to Dexane if acetat is used as a substrat and less with other substrates (the least with glucose).

Conidia are less sensitive towards Dexane than young mycels.

γ-Hexachlorohexane (Gammexane) can develop similar effects as Dexane. Using same concentrations the inhibition of assimilating reactions is less pronounced.

No antagonism can be demonstrated between Dexane and m-Inositol.

The effect of Dexane upon the energy metabolism of the cells of Neurospora crassa is compared with those of "uncoupling" agents like 2,4-Dinitrophenole. The growth inhibiting effect of Hexachlorohexanes towards microorganisms can be explaned by the inhibition of reactions which supply energy.

Literatur

D'Amato, F.: Caryologia **1**, 209, 223 (1949).

Bastiansen, O., Ø. Ellefsen and O. Hassel: Acta chem. scand. **3**, 918 (1949); Research **2**, 248 (1948).

Bauer, K. H.: Die org. Analyse. Leipzig: Akad. Verl. Ges. 1950.

Bijvoet, J. M.: Rec. Trav. chim. Pays-Bas **67**, 777 (1948).
Brody, T. M.: Pharmacol. Rev. **7**, 335 (1955).
Buston, H. W., S. E. Jacob and A. Goldstein: Nature (Lond.) **158**, 22 (1946).
Carpentier, S., et C. Fromageot: Biochim. biophys. Acta **5**, 290 (1950).
Chaix, P.: Bull. Soc. Chim. biol. (Paris) **30**, 835 (1948 c).
Chaix, P., et L. Lacroix: Biochim. biophys. Acta **2**, 86 (1948 b).
Chaix, P., L. Lacroix et C. Fromageot: Biochim. biophys. Acta **2**, 57 (1948 a).
Chargaff, E., R. N. Stewart and B. Magasanik: Science **1948**, 556.
Chance, B., and G. R. Williams: Advanc. Enzymol. **17**, 65 (1956).
Clifton, C. E.: Advanc. Enzymol. **6**, 269 (1946). In Sumner, J. B., and K. Myrbäck: II. **2**, 912 (1952).
Demuth, G., u. L. Lendle: Arch. Pharm. Berlin **284**, 298 (1951).
Fromageot, C.: Diskussionsbemerkung bei Chaix, P. 1948 c (1948 c).
Fromageot, C., et M. Confino: Biochim. biophys. Acta **2**, 142 (1948 a).
Fromageot, C., et T. Sejourne: Biochim. biophys. Acta **2**, 478 (1948 b).
Fuller, R. C., R. W. Barrat and E. L. Tatum: J. biol. Chem. **186**, 823 (1950).
Gauvadan, P., et H. Poussel: C. R. Acad. Sci. (Paris) **1947**, 683.
Hassel, O.: Research **3**, 504 (1950).
Helge, H.: Dissertation F. U. Berlin 1956.
Hotchkiss, R. D.: Advanc. Enzymol. **4**, 153 (1944).
Keller, H.: Hoppe-Seylers Z. physiol. Chem. **295**, 15 (1953).
Kirkwood, S., and P. H. Phillips: J. biol. Chem. **163**, 251 (1946).
Lane, R. L., and R. J. Williams: Arch. Biochem. **19**, 329 (1948).
Mc Namarra, B. P., and S. Krop: J. Pharmacol. exp. Ther. **92**, 147 (1948); Science **1949**, 330.
Oiwa, T., R. Yamada and M. Ottno: Bull. Inst. Chem. Res. Kyoto Univ. **29**, 38 (1952).
Orloff, H. D., A. J. Kolka, G. Callingert, M. E. Griffing and E. R. Kerr: J. Amer. chem. Soc. **75**, 4243 (1953); **76**, 1244 (1954).
Poussel, H.: Gallica Biol. Acta **1**, 11 (1948); C. R. Acad. Sci. (Paris). **1949**, 1533.
Riemschneider R.: Zur Kenntnis der Kontaktinsecticide. Pharmazie 1. Erg. Bd. 9. Beiheft 1950; Z. Naturforsch. **6** B, 413 (1951); **7**B, 125 (1952).
Riemschneider, R., u. W. Gerischer: Z. Naturforsch. **3**B, 267 (1948). — Pharmazie **6**, 108 (1951).
Ryan, F. J.: Meth. med. Res. **3**, 51 (1950).
Ryan, F. J., G. W. Beadle and E. L. Tatum: Am. J. Bot. **30**, 784 (1943).
Schneider, H. H., u. L. Lendle: Naunyn-Schmiedeberg's Arch. exp. Path. Pharmak. **210**, 119 (1950). — Pharmazie **5**, 382 (1950).
Schopfer, W. H.: Diskussionsbeitrag zu Chaix, P. 1948 c (1948 a). — Bull. Soc. Chim. biol. (Paris) **33**, 1113 (1951).
Schopfer, W. H., u. M. L. Bein: Experientia (Basel) **4**, 147, 222 (1948 b).
Schopfer, W. H., T. Posternak u. M. L. Boss: Schweiz. Z. Path. **10**, 443 (1947).
Schopfer, W. H., T. Posternak und H. Haenni: Helv. physiol. pharmacol. Acta **12**, C 30 (1954).
Simon, I.: Dissertation. Berlin: F. U. 1955.
Slade, R. E.: Chem. a. Ind. **1945**, 314. — Endeavour **4**, 148 (1945).
Soderhjelm, L., u. B. Zetterberg: Upsala Läk.-Fören. Förh. **53**, 235 (1948).

Spiegelmann, S.: in Sumner, J. B., u. K. Myrbäck: I. **1**, 267 (1952).
Spiegelmann, S., and M. Sussmann: Ann. Rev. Physiol. **14**, 97 (1952).
Sumner, J. B., and K. Myrbäck: The Enzymes. Academic Press. New York 1952.
Tirunarayanan, M. O., and P. S. Sarma: J. Sci. Ind. Res. **12B**, 251 (1953).
Utjino, S., M. Onoyama and T. Nakao: Acta Sch. med. Univ. Kioto **30**, 123 (1952).
Vloten, G. W. van, C. A. Kruissink, B. Strijk and J. M. Bijvoet: Nature (Lond.) **162**, 771 (1948).
Yoshida, A.: Sympos. Enzyme Chem. (Jap.) **7**, 89 (1952); zit. n. Chem. Abstr. 46, 9658c (1952). — Sci. Papers Coll. Gen. Educat. Univ. Tokyo **3**, 151 (1953); zit. n. Ber. ges. Physiol. **170**, 268 (1954).
Yoshida, A., and A. Yamataka: J. Biochem. (Tokio) **40**, 85 (1953).

Dr. med. Hans Helge,
Pathologisches Institut d. Univ. Kiel, Hospitalstr. 42

Arch. exper. Path. u. Pharmakol., Bd. 233, S. 422—430 (1958)

Aus der Medizinischen Forschungsanstalt (Biochemische Abteilung) der Max-Planck-Gesellschaft Göttingen
(Direktor: Prof. Dr. K. Thomas)

Histochemische Studien zur Ausscheidung des Bleisalzes der Äthylendiamintetraessigsäure durch die Rattenniere

Von
F. Timm und M. Arnold

Mit 5 Textabbildungen

(Eingegangen am 29. Januar 1958)

Bersworth schlug 1949 als erster die therapeutische Anwendung des Dinatriumsalzes der Äthylendiamintetraessigsäure (ADTE-Na) bei Bleivergiftungen vor. Seitdem ist eine Fülle kasuistischer Mitteilungen im Weltschrifttum erschienen, die sich mit der erfolgreichen ADTE-Na-Therapie befassen (Bell, Giles, Kubistova, Merlevede, Perrault, Reinl, Rieders, Rubin (2), Ruotolo, Sidbury u. a.). Als besonders günstig muß erscheinen, daß in dem ADTE-Na eine nach Foreman (1) weitgehend ungiftige, nicht metabolisierbare Substanz mit großer Blei-Affinität zur Verfügung steht.

Der Stoffwechsel physiologischer Spurenelemente wird nach Shiels durch ADTE-Na nicht beeinflußt. Manville konnte keine Abweichungen im Zn- und Co-Stoffwechsel nachweisen. Ein mit Entfernung des Zn aus den Langerhansschen Inseln erklärbarer Diabetes mellitus wurde bisher nicht beobachtet.

Vorsicht ist indes im Hinblick auf den Calciumstoffwechsel geboten. Foreman (1) konnte durch rasche i.v. Injektionen bei Ratten eine so rapide Ca-Bindung herbeiführen, daß die Tiere im tetanischen Schock verendeten. Diese Gefahr kann umgangen werden, wenn statt des freien ADTE-Na der Calciumkomplex verwendet wird, der überdies den Vorteil höherer Wasserlöslichkeit aufweist.

Die Stabilitäten des zugeführten Ca-Salzes und des Pb-Salzes unterscheiden sich derart, daß es im Körper zu einem Austausch von Ca gegen Pb kommt. Für Lösungen der Ionenstärke 0,1 betragen die p_K-Werte für das Ca-Salz 10,6, für das Pb-Salz 18,2 (Schwarzenbach).

Nach irrtümlich zu hoher ADTE-Na-Ca-Dosis sah Vogt eine nekrotisierende Nephrose, deren Entstehungsmechanismus unklar ist. Dudley beschreibt die Autopsiebefunde von 2 Fällen mit Hypercalcämie, die unter einer ADTE-Na-Therapie starben. Es fanden sich Degenerationen

der proximalen Tubuli contorti, wie sie von Foreman (2) nach ADTE-Na auch in der Rattenniere gefunden wurden.

Shapiro untersuchte eine 34% Pb-ADTE-Na-Lösung auf ihre Verwendbarkeit in der Kontraströntgenographie. Die rasche Eliminierung des Pb-ADTE führte schon nach 5 min zu einer Kontrastdarstellung der Nieren, die dann 20 min sichtbar blieben. Die bisher untersuchten Metall-ADTE-Na-Salze zeigten im Tierversuch eine Ausscheidungsquote von etwa 70% der injizierten Substanz im 24 Std-Harn.

Aus diesen Untersuchungen wird ersichtlich, daß in den Schwermetall-ADTE-Na-Salzen metallorganische Verbindungen mit hoher Nierengängigkeit und nur geringer Rückresorption vorliegen. Da nach unseren Untersuchungen Blei aus Pb-ADTE-Na durch H_2S quantitativ fällbar ist, schien uns die Vorbedingung zur Durchführung der Sulfid-Silber-Methode (Timm) gegeben und damit die Möglichkeit, mit histochemischer Methodik die Frage der Metallausscheidung durch die Nieren zu klären. Außerdem hofften wir, auf diese Weise einen Einblick in die allgemeine Nierenfunktion zu erhalten. Wir stellten daher Pb-ADTE-Na und auch die entsprechenden Salze des Cd, Cu, Hg und Zn präparativ dar.

Methodik

Um den Einfluß von Fremdionen auszuschalten und die Salze in reiner Form zu erhalten, wählten wir als Ausgangssubstanz das jeweilige Oxyd des betreffenden Metalls und ließen es in neutralem Milieu mit dem Dinatriumsalz der ADTE reagieren.

Äquimolare Mengen des Metalloxydes und ADTE-Na wurden in bidest. Wasser über mehrere Stunden geschüttelt. Nachdem sich aller Bodensatz gelöst hatte, wurden die Lösungen im Vakuum bei 50° C auf ein Fünftel des Ausgangsvolumens eingeengt. Die Me-ADTE-Na-Salze wurden durch Zugabe von Alkohol aus der wäßrigen Lösung gefällt, mit Äther gewaschen und kristallin gewonnen. Metall- und Stickstoffanalysen des jeweiligen ADTE-Na-Salzes ergaben für Me:N_2 ein Verhältnis 1:1. (Für Pb-ADTE-Na: Eingesetzt 0,8403 g Pb-ADTE-Na, Pb berechnet 0,3005 g, gefunden als $PbSO_4$ 0,2856 g. Eingesetzt 0,8056 g Pb-ADTE-Na, N berechnet 0,03895 g, gefunden 0,0352 g (Kjeldahl). Als Versuchstiere dienten erwachsene Albinoratten, beiderlei Geschlechts, die vor und während des Versuchs „LATZ-Standardkost" und Wasser ad libidum erhielten. Die Injektionslösungen wurden durch Auflösen des Salzes in bidest. Wasser bereitet und den Tieren im akuten Versuch intraperitoneal, sonst subcutan injiziert.

Die Organe wurden lebendfrisch entnommen und sofort in kaltem H_2S-Alkohol fixiert, um Metallverschiebungen innerhalb der Gewebe zu vermeiden. Hartgewebe wurde mit H_2S-gesättigter 20%iger Ameisensäure entkalkt, in 20% H_2S-Na_2SO_4-Lösung entsäuert und nach Wässerung in H_2S-Wasser im Kyrostaten geschnitten. Die Organe wurden in üblicher Weise nach Paraffineinbettung geschnitten und mit der von Timm angegebenen Methode physikalisch entwickelt.

Ergebnisse

In Übereinstimmung mit anderen Untersuchern können wir die geringe Giftigkeit des Pb-ADTE-Na-Salzes bestätigen. 450 mg/kg Ratte wurden von den Tieren ohne Beeinträchtigung des Befindens vertragen. 140 mg/kg, über Wochen täglich gegeben, führten zu keiner auf ein

Pb-Wirkung beziehbaren Erscheinung. In ähnlicher Weise wurden von den Tieren die Cadmium- und Zinksalze der ADTE-Na ohne Beeinträchtigung vertragen. Das Kupfer- und besonders das Quecksilbersalz der ADTE-Na zeigten eine bedeutende Giftigkeit. Hierüber soll später in anderem Zusammenhang berichtet werden.

Wir bestimmten die im Urin innerhalb 24 Std ausgeschiedene Pb-Menge zu 68% der injizierten. Dieser Wert steht in guter Übereinstimmung mit aus der Literatur entnommenen Werten.

Histochemische Untersuchungen der Knochen und Zähne zeigten, daß die Pb-Ausscheidung keineswegs quantitativ erfolgt. Ein Teil des als

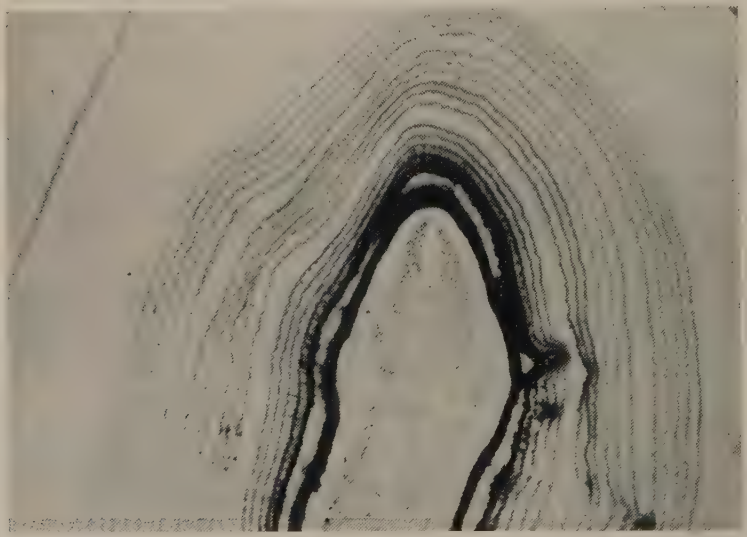


Abb. 1. Sulfidsilberbild eines Querschnittes des unteren Schneidezahnes der Ratte. Etwa 50mal

Pb-ADTE-Na in den Körper eingebrachten Pb wurde in den Zähnen und Knochen abgelagert wiedergefunden, periodisch in den Schneidezähnen einer erwachsenen Ratte, die an 17 Tagen jeweils 30 mg Pb-ADTE-Na = 140 mg/kg Ratte erhalten hatte (Abb. 1).

Jeder Ring entspricht einer der täglichen Injektionen, die beiden breiteren Zwischenräume den injektionsfreien Sonntagen. Ein einzelner Streifen findet sich an der Zahnaußenfläche (Abb. 1).

Bei einem Kontrolltier fand sich 11 Tage nach Einverleibung von Pb-Acetat im Zahn nur ein Streifen in einer der Zeit entsprechenden Entfernung von der Pulpahöhle.

Die Nieren wurden bei der Fixierung in H_2S-Alkohol durch PbS-Bildung tiefschwarz.

Nach physikalischer Entwicklung finden sich mikroskopisch in der Niere einer mit Pb-ADTE-Na behandelten Ratte ausgedehnte dunkle

Bezirke infolge einer starken Ansammlung schwarzer Körnchen und Niederschläge durch Silberanlagerung vergrößerter Bleisulfidteilchen in verschiedenen Abschnitten des Nephrons.

Die Ablagerungen liegen so dicht gegenüber jenen einer normalen Niere, daß sich ein frühzeitiger Abbruch der physikalischen Entwicklung empfiehlt, um eine Verklumpung und zu starke Schwarzfärbung zu vermeiden.

Die Glomerula fallen als inhomogene, grau-schwarze Bezirke ins Auge, ihre Struktur erscheint verwaschen. Das durch Silberanlagerung

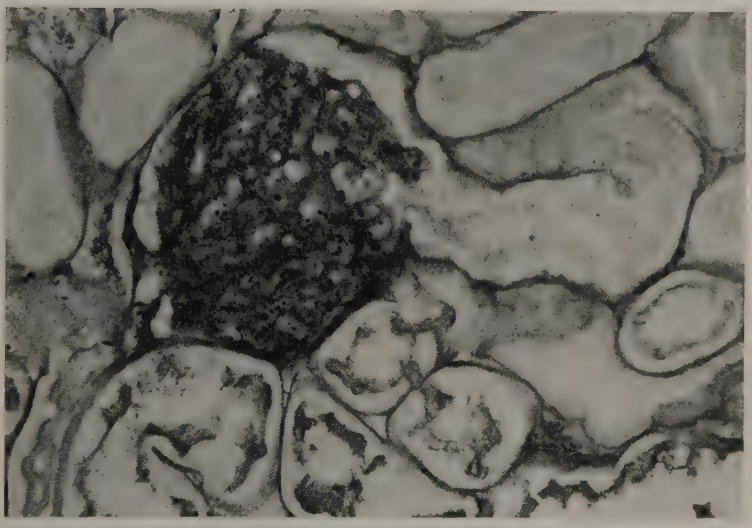


Abb. 2. Sulfidsilberbild einer Rattenniere, 5 min p. I. Etwa 400mal

vergrößerte PbS liegt in den Lumina und angelagert an die Basalmembranen der Capillarschlingen (Abb. 2).

In einem Teil der Tubuli contorti I finden sich zum Lumen arkadenförmig angeordnete PbS-Körnchen im Bereich des Bürstensaumes. Die basalen Zellanteile sind weitgehend frei. Wie Abb. 2 zeigt, liegen nur wenige Körnchen in den proximalen Tubulusabschnitten, eine stärkere Ansammlung findet sich erst weiter distal im Lumen und Bürstensaumbereich der Tubuli contorti I.

Die Bowmannsche Kapsel und die Basalmembranen der Tubuli contorti werden ausgeprägt dargestellt.

Die Lichtungen der Tubuli recti des äußeren Markstreifens sind nahezu leer, die Basalmembranen auch hier deutlich sichtbar. Papillenwärts finden sich die Lumina der Tubuli recti zunehmend stärker angefüllt.

Die Henlesche Schleife erscheint am Scheitelpunkt in auffälliger Weise diffus grau (Abb. 3).

5 min nach der Injektion ist weiter distal kein auffallender Befund zu erheben.

15 min nach der Injektion sind die Glomerula weitgehend frei, die Bürstensäume der Tubuli contorti I nur noch schemenhaft zu erkennen,

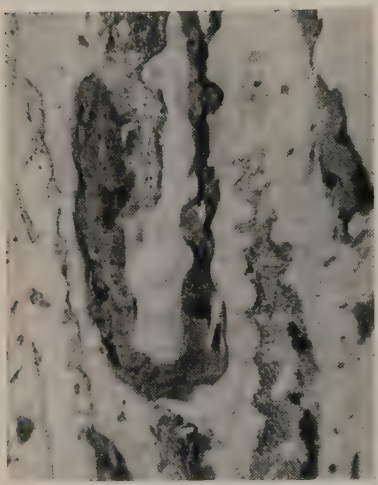


Abb. 3. Sulfidsilberbild, Henlesche Schleife. Rattenniere 15 min p. i., etwa 300mal

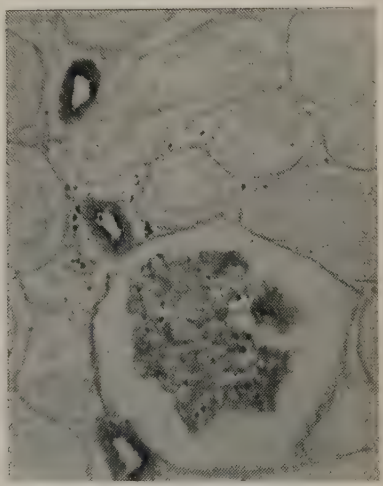


Abb. 4
Tubuli contorti II, sonst wie Abb. 3

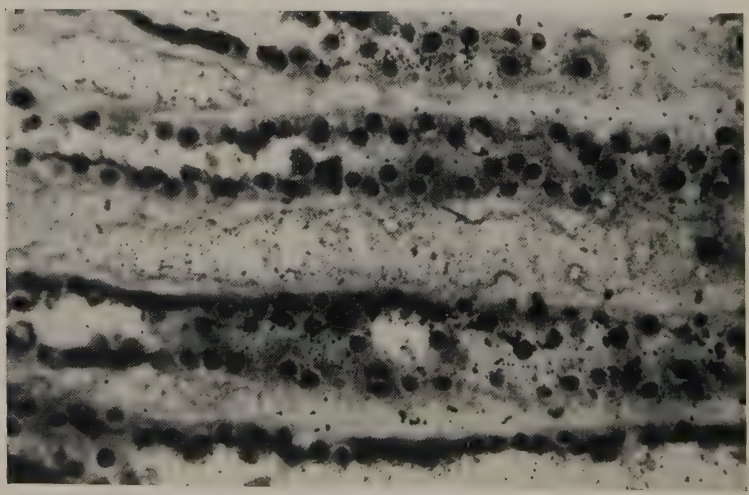


Abb. 5. Sammelröhren, Rattenniere, 15 min p. i., etwa 180mal

die Basalmembranen schwach sichtbar. Auffallend ist, daß die Henleschen Schleifen auch jetzt noch unvermindert grau erscheinen. Weiter distal sind die Zellen der Tubuli contorti II selektiv dargestellt (Abb. 4).

Besonders eindrucksvoll ist der Befund der 15 min p. I. maximal ausgeprägten Anfärbung der Sammelrohrzellkerne (Abb. 5). Die Anfärbung der Zellkerne beginnt sich schon in den Schaltstücken abzuzeichnen.

Zugleich werden die Lumina der Sammelrohre zur Papille hin mit schwarzen Massen stärker angefüllt.

Diskussion der Befunde

Eine annähernd quantitative Pb-Ausscheidung ist bei einer Pb-Intoxikation erfahrungsgemäß durch ADTE-Na nicht ohne weiteres erreichbar. Die Pb-Ausscheidung steigt in den ersten Tagen nach ADTE stark an, sinkt aber bald trotz Dosiserhöhung ab. Wird nach einwöchentlicher Pause erneut ADTE-Na gegeben, so kommt es wieder vorübergehend zu einer starken Pb-Ausscheidung. ADTE bewirkt zunächst eine Ausschwemmung des mobilen Pb. Nach dessen Eliminierung muß sich ein neues Gleichgewicht einstellen, erst dann hat die ADTE-Medikation wieder Erfolg.

Hartgewebe und Blut können als 2 Lösungsmittelsysteme aufgefaßt werden, zwischen denen sich Pb nach Maßgabe eines Verteilungskoeffizienten verteilt. Die Höhe desselben ist abhängig vom p_H, der Pb-Affinität des betreffenden Gewebes und der Stabilität der entstehenden Pb-Verbindung.

Pb-ADTE-Na dissoziiert nach Maßgabe seiner Dissoziationskonstanten und es kommt bei dem im Körper herrschenden Überschuß von Ca zu einem, wenn auch geringen Austausch von Pb gegen Ca an Stellen mit großem Ca-Überschuß. Das ausgetauschte Pb wird in Zähnen und Knochen abgelagert (Abb. 1). Jede Injektion ist als gut abgesetzter Ring sichtbar und läßt zugleich die Wachstumsgeschwindigkeit eines Nagetierzahnes bei erwachsenen Tieren erkennen. Für die Therapie kann hieraus der Schluß gezogen werden, daß mit einer ADTE-Medikation zwar eine weitgehende Pb-Verarmung, aber keine Pb-Freiheit zu erzielen ist, da sich das Verhältnis Ca : Pb immer mehr zugunsten des Ca verschiebt.

Analoge Überlegungen gelten auch für die Therapie radioaktiver Schwermetalle, Urane, Transurane, bei denen die ADTE-Therapie empfohlen wurde (Dagirmanjian, Norwood). Die genannten Elemente werden wie Pb im Knochen abgelagert, von wo aus sie nur teilweise durch ADTE herauszulösen sind. Jüngste Untersuchungen durch Hauschild zeigen dies auch für Thorium.

Die an der Niere nach Pb-ADTE-Na erhobenen Befunde bestätigen die von Rubin (1) angegebene rasche Eliminierung von Pb-ADTE-Na durch die Nieren.

Im Hinblick auf die massive Ansammlung von PbS in den Glomerula wird die Ausscheidung vorwiegend durch Filtration erfolgen.

Eine geringe Rückresorption scheint nur in den Zellen der Tubuli contorti II stattzufinden, gegen eine erhebliche Rückresorption spricht auch der Befund, daß die Lumina der Harnkanälchen zunehmend stärker mit schwarzen Massen angefüllt sind.

Es ist verlockend, unsere Befunde mit der von Wirz u. Mitarb. aufgestellten und experimentell gestützten Hypothese zu vergleichen. Die genannten Autoren erklären den Mechanismus der Harnkonzentrierung durch die Summierung kleiner osmotischer Einzeleffekte in einem Gegenstromsystem. Die diffuse Graufärbung der Henleschen Schleife zu einer Zeit, da die Rinde schon wieder frei ist, könnte als bestätigender Hinweis hier angeführt werden.

Bis in die jüngste Zeit galten die Sammelrohre als lediglich der Ableitung des fertig bereiteten Harns dienend. Hierfür wurde auch ihre geringe biochemische Aktivität (Weil, Wackstein) angeführt.

Wirz konnte durch Punktion der Sammelrohre den Nachweis erbringen, daß der Harn keineswegs unverändert die Sammelröhren passiert, sondern hier erst endgültig konzentriert wird und Richterlich-van Baerle zeigte durch Messung der Glutaminase-Aktivität die Bildung und Sekretion von NH_3 im Bereich der Sammelrohre. Glimstedt erbrachte den Beweis für die Rückresorption von Phosphat mit ^{32}P, Drenkhahn für die von Sulfat mit ^{35}S.

Unsere vorstehend angeführten Untersuchungsergebnisse bestätigen diese neueren Auffassungen über die Funktionen der einzelnen Nephronabschnitte und insbesondere die aktive Mitwirkung der Sammelrohrzellen bei der Harnbereitung.

Zusammenfassung

1. Die Darstellung des Blei- und der entsprechenden Cd-, Cu-, Hg- und Zn-Salze des Dinatriumsalzes der Äthylendiamintetraessigsäure wird beschrieben.

2. Pb-ADTE-Na ist auch bei häufiger Einverleibung nicht nennenswert toxisch. Es wird schnell durch die Nieren ausgeschieden. Die Elimination wird mit der Sulfid-Silber-Methode in der Niere verfolgt. Die Befunde werden beschrieben, wobei besonders auf die Ablagerungen von Pb in den Sammelrohrzellen hingewiesen wird.

3. Zu einem kleinen Teil wird Pb in den Hartgeweben gegen Ca ausgetauscht und abgelagert. In den wachsenden Schneidezähnen der Ratte entsprechen die Ablagerungen den zeitlichen Abständen der Einverleibung, so daß auf die Wachstumsgeschwindigkeit geschlossen werden kann.

4. Die Befunde werden im Hinblick auf die therapeutische Beeinflußbarkeit der Pb-Vergiftung und die Vorgänge bei der Harnbereitung diskutiert.

Mit Unterstützung der Deutschen Forschungsgemeinschaft.

Literatur

Bell, R. F., J. C. Gilliland and W. S. Dunn: Urinary Mercury and Lead Excretion in a case of Mercurialism. Differential Excretion after Administration of Edathamil Calcium and Dimercaprol. Arch. indust. Health **11**, 231 (1955).

Dagirmanjian, R., E. A. Maynhard and H. C. Hodge: The Effects of Calcium Disodium Ethylenediamin Tetraacetate on Uranium Poisoning in Rats. J. Pharmacol. exp. Ther. **117**, 20 (1956).

Drenkhahn, F. O., u. J. Meissner: Autoradiographische Untersuchungen über die Lokalisation von $Na_2\ ^{35}SO_4$ in der Meerschweinchenniere. Naunyn-Schmiedeberg's Arch. exp. Path. Pharmak. **227**, 444 (1956).

Dudley, H. R., A. C. Ritchie, A. Schilling and W. H. Baker: Pathologic Changes associated with the Use of Sodium Ethylenediamin Tetraacetate of Hypercalcaemia. N. England J. M. **252**, 331 (1956).

Foreman, H.: (1) Use of Calcium Ethylenediaminetetraacetate in treating Heavy-Metal Poisoning. Report of a Conference Held at Massachusetts General Hospital. Arch. industr. Hyg. **7**, 137 (1953).

Foreman, H., C. Finnegan and C. C. Cushbauch: (2) Nephrotoxic Hazard from Uncontrolled Edathamil Calcium-Disodium Therapy. J. Amer. Ass. med. Rec. Libr. **160**, 1042 (1956).

Giles, H. McC., C. J. Moore and Bessie M.Still: Treatment of Lead Poisoning with Calcium Disodium Versenate. Lancet **1955**, 183.

Glimstedt, G., H. R. Johannsson u. N. Jonsson: zit. n. Drenkhahn, F.O., u. J. Meissner: Verh. anat. Ges. (Jena) **50**, 182 (1952).

Hargitay, B., u. W. Kuhn: Das Multiplikationsprinzip als Grundlage der Harnkonzentrierung in der Niere. Z. El. Ch. **55**, 539 (1951).

Hauschild, F., u. S. Dentzer: Zur Ausscheidung von Thorium-Äthylendiamintetraessigsäure. Naturwissenschaften **44**, 563 (1957).

Kosai, M. F., and A. J. Boyle: Ethylenediamintetraacetic Acid in Manganese Poisoning of Rats—A Preliminary Study—. Indust. Med. Surg. **25**, 1 (1956).

Kubistova, J.: Effect of Edathamil Calcium-Disodium on Lead Acetate Intoxication. Observation of Effect on experimental acute lethal Intoxication in Mice. Arch. indust. Health **13**, 556 (1956).

Manville, I. A., and R. Moser: Recent Developments in the Care of Workers exposed to Lead. The Effect of the Calcium Chelate of Disodium Ethylenediamine-Tetraacetic Acid on Lead in the Blood and Urine of Battery Workers. Arch. indust. Health **12**, 528 (1955).

Merlevede, E.: Perturbations Biochemiques en Toxicologie industrielle. Le Mecanisme des Intoxications dues au Plomb, aux Hydrocarbures volatils et au Sulfur de carbone. Arch. belges. Méd. soc. **14**, 194 (1956).

Norwood, W. D., P. A. Fuqua and B. C. Scudder: Treatment of Acute Plutonium Poisoning. Indust. Med. Surg. **25**, 135 (1956).

Perrault, M., R. Truhant, B. Klotz, C. Bondene, C. Dreux, B. Clavel et F. Chain: Sur l'efficacite de l'intoxication saturnine professionelle. Arch. Prof. Malad. **17**, 423 (1956).

Reinl, W.: Prophylaxe bei Bleiarbeiten mit oralen Gaben von Dikalzium äthylendiamintetraessigsäure (Ca-ADTE). Zbl. Arbeitsmed. **6**, 5 (1956).

Richterlich-van-Baerle, R., L. Goldstein and Earl H. Dearborn: Ammonia Production in the Collecting Ducts of Mammalian Kidneys. Nature (Lond.) **178**, 698 (1956).

Rieders, F., W. G. Dunnington and H. Breiger: The Efficancy of Edathamil-Calcium Disodium in the Treatment of Occupational Lead Poisoning. Indust. Med. Surg. **24**, 195 (1955).

Rubin, M.: (1) Use of Calcium Ethylenediamintetraacetate in Heavy-Metal Poisoning. Report of a Conference Held at Massachusetts General Hospital Arch. industr. Hyg. **7**, 142 (1953).

Rubin, M., S. Gignac, S. P. Bessman and E. L. Belknap: (2) Enhancement of Lead Excretion in Humans by Disodium Calcium Ethylenediamine-Tetraacetate. Science **1953**, 659.

Routolo, B. P. W., and H. P. Elkins: Lead and Coproporphyrin Excretion of Patients treated with EDTA. Arch. industr. Hyg. **9**, 205 (1954).

Schwarzenbach, G.: Die komplexometrische Titration. Stuttgart: F. Enke 1955.

Shapiro, R.: Chelation in Contrast Roentgenographie with special Reference to Lead Disodium EDTA. Amer. J. Roentgenol. **76**, 161 (1956).

Shiels, D. O., D. L. G. Thomas and E. Kearley: Treatment of Lead Poisoning by Edathamil Calcium Disodium. Arch. indust. Health **13**, 489 (1956).

Sidbury, J. B., J. Byunn and L. L. Fetz: Effect of Chelating Agent on Urinary Lead Excretion. Comparison of oral and intravenous Administration. Proc. Soc. exp. Biol. (N. Y.) **82**, 226 (1953).

Timm, F.: Zur Histochemie der Schwermetalle. Das Sulfid-Silberverfahren. D. Z. Ger. Med. **46**, 706 (1957).

Vogt, W.: Nekrotisierende Nephrose nach Behandlung einer subakut-chronischen Bleivergiftung mit Versenat in hohen Dosen. Schweiz. med. Wschr. **1957**, 665.

Wackstein, M. J.: Histochemical Staining Reactions of the normally Functioning and abnormal Kidney. J. Histochem. Cytochem. **3**, 246 (1955).

Weil, L., and R. K. Jennings: Investigations in Enzymatic Histochemistry. III. Distributions of Enzymes in Rabbit Kidney. J. biol. Chem. **139**, 421 (1941).

Wirz, H., B. Hargitay u. W. Kuhn: Lokalisation des Konzentrierungsprozesses in der Niere durch direkte Kyroskopie. Helv. physiol. pharmacol. Acta **9**, 196 (1951).

Wirz, H.: Der osmotische Druck in den corticalen Tubuli der Rattenniere. Helv. physiol. pharmacol. Acta **14**, 353 (1956).

Prof. Dr. F. Timm, Med. Forschungsanstalt der Max-Planck-Ges., Göttingen

Arch. exper. Path. u. Pharmakol., Bd. 233, S. 431—437 (1958)

Aus dem Pharmakologischen Institut der Universität Frankfurt a. M.
(Direktor: Prof. Dr. P. Holtz)

Über die herzwirksame Komponente des Kobragiftes („Cardiotoxin")*

Von
H. W. Raudonat und B. Holler**

Mit 3 Textabbildungen

(Eingegangen am 21. Dezember 1957)

Als „*Cardiotoxin*" wird die Komponente des Kobragiftes bezeichnet, die das Herz schädigt, z. B. das isolierte Froschherz in der Versuchsanordnung nach Straub zum Stillstand bringt. 1947 gelang Sarkar durch Fällung des Vollgiftes mit Natriumsulfat die Anreicherung und Isolierung eines herzwirksamen Eiweißkörpers vom Molekulargewicht 46200. Andererseits ist bekannt, daß die *tödliche* Wirkung des Kobratoxins zum großen Teil an dialysable, also kleinmolekulare Bestandteile geknüpft ist (Wieland u. Konz). In einer früheren Arbeit hatte sich durch papierchromatographische Auftrennung des lyophilisierten Dialysates, das 70—80% des Vollgiftes ausmacht, zeigen lassen, daß dieses neben einer *Protease* einen Faktor enthält, der — im Gegensatz zu der im Dialyserückstand verbleibenden großmolekularen Lecithinase A — direkt *hämolytisch* wirkt und durch Fällung mit 45% Methanol angereichert werden kann (Raudonat 1955). In der vorliegenden Arbeit haben wir untersucht, ob auch die „cardiotoxische" Wirksamkeit des Kobragiftes wenigstens zum Teil kleinmolekularen, dialysablen Bestandteilen zukommt.

Methoden

1. Dialyse. 3 g frisch entnommenes gefriergetrocknetes Gift von *Naia nivea* werden in 30 ml Aqua dest. gelöst und nach dem Filtrieren 48 Std lang bei + 2° C unter ständigem Rühren in einem Kalle-Cellophanschlauch gegen 100 ml Aqua dest. unter 4maligem Wechsel der Außenflüssigkeit dialysiert (Endvolumen 400 ml). Dialysat und Dialyserückstand wurden gefriergetrocknet. Das lyophilisierte Dialysat wog 2 g (66% der eingesetzten Giftmenge).

2. Papierchromatographie („Gradientenchromatographie[1]"), Schl. & Sch.-Papier 2043a und 2043b (Rundfilter). Als Lösungsmittel bewährte sich ein

* Ausgeführt mit Unterstützung der Deutschen Forschungsgemeinschaft.

** Dr.-Dissertation B. Holler, Frankfurt a. M. 1957.

[1] Die Methode, deren Prinzip in einer Ausfällung verschieden löslicher Komponenten auf dem Papier durch kontinuierliche Zunahme der Alkoholkonzentration im Lösungsmittel besteht, wird an anderer Stelle ausführlich dargestellt (Raudonat 1958).

Gemisch aus n-Propanol : Pyridinacetat = 3 : 7 (Pyridinacetat : 8 ml Pyridin, 35 ml Eisessig, 57 ml Aqua dest.). Entwickelt wurde in einem dichtschließenden Glasgefäß bei 2° C in gesättigter n-Propanolatmosphäre, die durch 66%iges Propanol am Boden des Gefäßes aufrecht erhalten wurde.

Die Toxinlösung — 2 mg Lyophilisat in 0,05 ml Aqua dest. — wurde kreisförmig (Durchmesser etwa 3 cm) im Zentrum des Rundfilters aufgetragen. Lösungsmittel wurde durch eine 1 cm breite eingeschnittene Papierzunge des Filters, die in das Propanol-Pyridin-Acetatgemisch eintauchte, zugeführt. Die Laufzeit betrug 3—5 Std.

Die Chromatogramme wurden im Luftstrom getrocknet. Testsektoren wurden mit *Ninhydrin* (0,2%ig in Butanol, wassergesättigt) bzw. *Amidoschwarz* (siehe Grassmann u. Hannig) angefärbt. Entsprechende Anteile des Chromatogramms wurden nach dem Ausschneiden und Zerkleinern mit Aqua dest. eluiert und für die Testung am Froschherzen und Froschrectus mit Froschringer verdünnt.

3. Biologische Austestung am isolierten *Froschherz* nach Straub. 2 ml Froschringer in der Kanüle; am *Froschrectus* in 10 ml Froschringer.

4. Darstellung des „Cardiotoxins" nach Sarkar. 200 ml einer 1%igen Lösung von Kobratoxin (Naia tripudians oder Naia nivea) werden bei p_H 6,5 mit 44 g Na_2SO_4 (wasserfrei) versetzt. Nach 30 min langem Stehen wird der entstandene Niederschlag abzentrifugiert, in 150 ml Aqua dest. (p_H 6,5) gelöst, und die Fällung mit Na_2SO_4 noch 3mal wiederholt. — Der zuletzt erhaltene Niederschlag wird in 100 ml 0,9%iger NaCl-Lösung gelöst, die Lösung mit HCl auf p_H 2,8 gebracht und mit 17 g NaCl versetzt. Nach 30 min (37° C) wird vom ausgefallenen Niederschlag abfiltriert, dieser in Aqua dest. gelöst und die Lösung nochmals mit NaCl gefällt. Der jetzt entstandene Niederschlag wird in 50 ml Aqua bidest. (p_H 6,0) gelöst. Die durch Zusatz von 15 g NaCl erhaltene Fällung wird durch Dialyse (Kalle-Cellophan) von NaCl befreit und lyophilisiert.

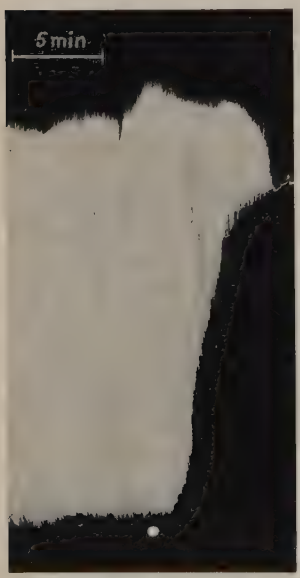


Abb. 1. Isoliertes Froschherz. Zusatz von 200 γ lyophilisiertem Dialysat aus Naiatoxin

Versuche

1. Dialysat

Das lyophilisierte Dialysat führt in einer Konzentration von 200 γ/ml regelmäßig innerhalb von 10—15 min am isolierten Froschherz zu systolischem Stillstand (Abb. 1). Die Wirkung ist nicht auswaschbar. An manchen Herzen läßt sie sich schon mit der 10fach geringeren Menge (20 γ/ml) erzielen. Diese Konzentration verursacht auch am isolierten Froschrectus eine irreversible Kontraktur. Durch papierelektrophoretische Auftrennung von Naia-Gift hatte Neumann, von Bienengift Hofmann ebenfalls eine muskelkontrahierende Wirkungskomponente nachweisen können.

Der herzwirksame Stoff ist weitgehend *hitzestabil*: weder $^1/_2$stündiges Kochen einer 2%igen wäßrigen Lösung des Dialysates noch ebenso

langes Kochen mit 0,05 n-HCl vermindert die Wirksamkeit. Erst beim Kochen mit 0,25 n-HCl oder 0,1 n-NaOH geht diese verloren.

Versetzt man die alkalisch inaktivierte Lösung mit Essigsäure, so werden durch Geruch und Bleiacetatpapier deutlich nachweisbare H_2S-Mengen frei. Nach Untersuchungen von Micheel u. Mitarb. besitzt das Dialysat des Naia-Giftes einen hohen *Schwefelgehalt*; dieser fand sich

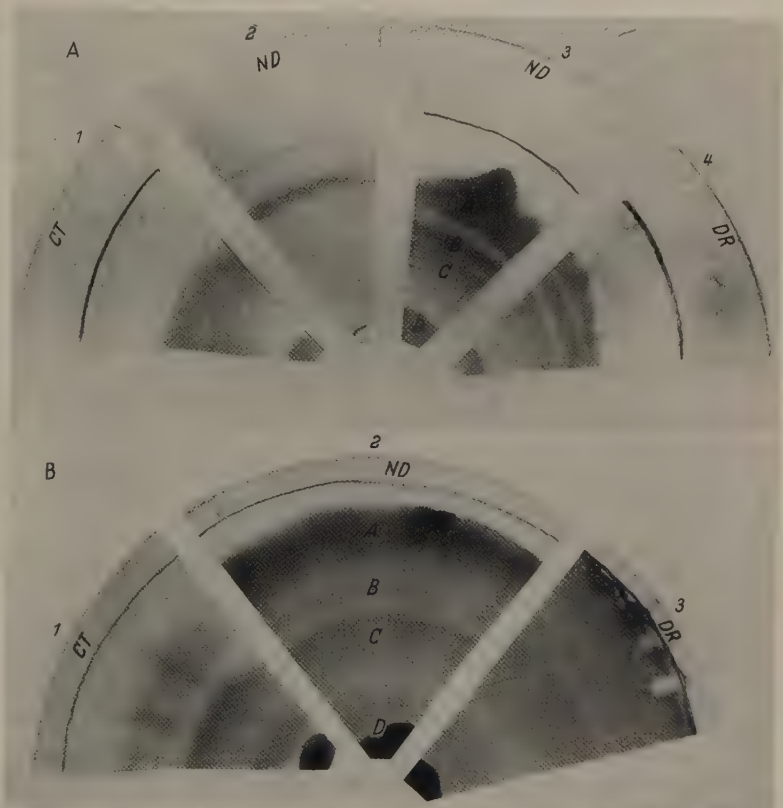


Abb. 2. Rundfilterchromatogramme (Naia—Toxin). — A *Ninhydrin- und Dithizonfärbung: 1* „Cardiotoxin" (Sarkar), Ninhydrinfärbung; *2* Dialysat, Dithizonfärbung; *3* Dialysat, Ninhydrinfärbung; *4* Dialyserückstand, Ninhydrinfärbung. — B *Amidoschwarzfärbung: 1* „Cardiotoxin" (Sarkar); *2* Dialysat; *3* Dialyserückstand

in Säurehydrolysaten zu etwa 20% als Cystinschwefel. Das steht im Einklang mit neueren Untersuchungen von Wellers, die auf das Vorhandensein von -S-S-Brücken im Vollgift hinweisen und auf deren Bedeutung für die Giftigkeit des Toxins.

Wir haben deshalb versucht, das herzwirksame Dialysat durch Inkubation mit *Cystein* zu inaktivieren. Aber selbst nach 20stündiger Inkubation des Toxins (1 mg lyophilisiertes Dialysat je Milliliter) mit der

doppelten Menge Cystein (2 mg/ml) hatte die zu systolischem Herzstillstand führende Wirkung nicht nachweisbar abgenommen.

Trägt man einige Milligramm des lyophilisierten Dialysates zur *Rundfilterchormatographie* (siehe Methodik) auf, so läßt sich eine Auftrennung in 4 Fraktionen erreichen, von denen die eine (D) am Start verbleibt, die anderen (C, B, A) sich durch ihre verschiedenen R_f-Werte voneinander unterscheiden (Abb. 2). Die beiden Fraktionen mit der größten Wanderungsgeschwindigkeit (A, B) unterscheiden sich von den anderen dadurch, daß sie im UV-Licht blau fluorescieren. Alle Fraktionen lassen sich mit *Ninhydrin* und *Amidoschwarz* anfärben. Für die Fraktion A ist charakteristisch, daß sie sich mit Ninhydrin nicht wie die anderen Fraktionen *blau*, sondern *rot* färbt. Die Ursache hierfür ist, daß sie den gesamten *Zink*gehalt des aufgetragenen Giftes enthält: besprüht man das Chromatogramm mit einer 0,1%igen Lösung von Dithizon in Chloroform, das mit Zink unter Bildung eines rotgefärbten Komplexes reagiert, so färbt sich nur die Fraktion A rot.

Untersucht man die einzelnen Fraktionen auf Herzwirksamkeit, indem man sie mit 0,9%iger NaCl-Lösung extrahiert, und die Eluate mit Froschringer so verdünnt, daß 1 ml 200 γ aufgetragenem Toxin entspricht, so ergibt sich, daß die Fraktionen A und B die wirksamsten sind. Sie verursachen nach 5—10 min langer Einwirkung Stillstand des isolierten Froschherzens (A etwas schneller als B), während die Fraktionen C und D auch in 4fach höherer Konzentration (800 γ/ml) hierzu nicht in der Lage sind.

2. Dialyserückstand

Ähnlich wie das lyophilisierte *Dialysat* des Naia-Toxins verursacht auch der lyophilisierte *Dialyserückstand*, wenn man ihn in der Konzentration von 200 γ/ml Froschringer zur Einwirkung bringt, am isolierten Froschherz systolischen Stillstand. Die „cardiotoxische" Wirkung des Naia-Vollgiftes scheint demnach durch zwei verschiedene Stoffe bedingt zu sein: einen kleinmolekularen, dialysablen und einen großmolekularen, nicht dialysablen. Der letztere könnte mit dem „Cardiotoxin" Sarkars identisch sein, das sich wie ein groß molekularer Eiweißkörper durch Natriumsulfat ausfällen ließ.

Eine andere Möglichkeit wäre jedoch, daß die sowohl im Dialysat als auch im Dialyserückstand nachweisbare cardiotoxische Wirkung nicht zwei verschiedenen Substanzen zukommt, sondern einem einzigen, kleinmolekularen und deshalb an sich dialysablen Wirkstoff, der aber nur zum Teil ins Dialysat übergeht, weil er zu einem anderen Teil an großmolekulare Proteine gebunden ist —, ähnlich wie an Insulin gebundenes Protamin, das auch als relativ kleinmolekularer Stoff dialysabel ist, seine Dialysierbarkeit durch Bindung an Insulin aber verliert.

Wir haben untersucht, ob sich aus dem Dialyserückstand (a) und aus dem nach der Methode von SARKAR aus Vollgift gewonnenen und erschöpfend dialysierten „Cardiotoxin" (b) mit Hilfe papierchromatographischer Methoden ein kleinmolekularer, dialysabler, herzwirksamer Stoff abtrennen läßt.

a) Die Abb. 2 zeigt, daß bei der Rundfilterchromatographie auch der *Dialyserückstand* sich in 4 Fraktionen auftrennen läßt (A4, B3), deren R_f-Werte mit denen der entsprechenden Fraktionen des Dialysates (A3, B2) übereinstimmen. Das Chromatogramm unterscheidet sich von demjenigen des lyophilisierten Dialysates lediglich dadurch, daß am Start eine größere Proteinmenge zurückbleibt. Die Fraktionen A beider Chromatogramme stimmen darin überein, daß sie die höchste Herzwirksamkeit besitzen und sich mit *Ninhydrin* nicht wie die anderen Fraktionen *blau*, sondern — in gleicher Weise wie mit *Dithizon — rot* anfärben (Zinkgehalt). — Eluiert man die Fraktionen A, B und C des vorher erschöpfend dialysierten Dialyse-Rückstandes und unterwirft die Eluate einer Dialyse, so geht ein mit Pikrinsäure fällbarer Stoff in das Dialysat über. Bei der chromatographischen Auftrennung sind demnach kleinmolekulare, dialysable Stoffe freigesetzt worden.

b) Aus der Abb. 2 geht hervor, daß auch das nach SARKAR aus Volltoxin durch Fällung mit Natriumsulfat gewonnene und anschließend erschöpfend dialysierte „Cardiotoxin" sich papierchromatographisch in 4 Fraktionen auftrennen läßt, von denen die Fraktionen A, B und C den gleichen R_f-Wert wie die entsprechenden Fraktionen des Dialysates und Dialyse-Rückstandes haben. Im Gegensatz aber zur Fraktion A des Dialysates und Dialyse-Rückstandes färbt die gleiche Fraktion des mit Natriumsulfat gefällten und dialysierten „Cardiotoxins" sich mit *Dithizon nicht* und mit *Ninhydrin* nicht rot, sondern blau. Sie enthält also kein Zink mehr.

3. Versuche mit Steroidreagentien

Die Anfärbbarkeit der papierchromatographisch gewonnenen Fraktionen mit *Ninhydrin* spricht zwar für das Vorhandensein von Aminosäuren oder Peptiden, schließt aber nicht aus, daß die digitalisartige, „cardiotoxische" Wirkung *Steroiden* zukommt, die diesen vielleicht beigemengt sind. Versuche, durch Besprühen der Chromatogramme bzw. Behandlung der eingeengten Eluate der einzelnen Fraktionen mit Steroidreagentien, mit denen vor allem die Glykoside des *Cardenolid*-Typs (5-Lactonring) eine orange-gelb-blaue Fluorescenz geben, das Vorhandensein von Steroiden nachzuweisen, waren erfolglos. Als Reagentien kamen u. a. zur Anwendung: Essigsäureanhydrid-Chloroform-Schwefelsäure; alkoholische Trichloressigsäure-Chloramin; Phosphormolybdänsäure in Äthanol.

4. Spektrophotometrische Untersuchungen

Die Herzgifte der verschiedenen *Krötenarten* (Bufagin, Bufotalin) lassen sich ähnlich wie die Scillaglykoside („*Bufo*-Typ", 6-Lactonring) mit den gebräuchlichen Steroidreagentien kaum anfärben. Sie besitzen aber ein charakteristisches UV-Absorptionsmaximum (bei 300 mμ). Wir haben deshalb das UV-Spektrum des herzwirksamen *Naia-Dialysates* aufgenommen (Zeiss-Spektrophotometer PQ II) und mit dem des *Scillarens* verglichen. Das Fehlen des für Scillaren charakteristischen Absorptionsmaximums schließt auch das Vorhandensein von Steroiden des „Bufo-Typs" aus (Abb. 3).

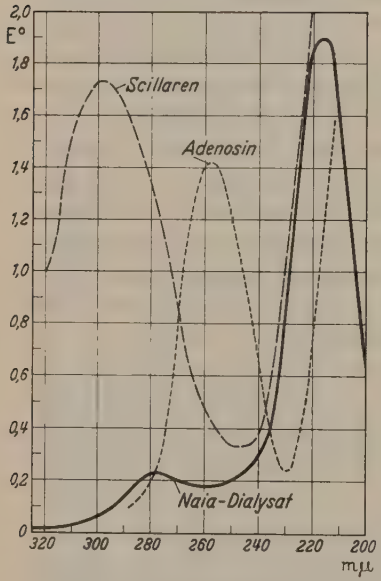


Abb. 3. UV-Absorptionsspektren: Naia-Dialysat (500 γ/ml), Scillaren A (100 γ/ml), Adenosin (300 γ/ml). Abszisse: Wellenlänge in mμ. Ordinate: Extinktion bei 0,2 mm Spaltbreite und 10 mm Schichtdicke

Das Gift der *Puffotter* (Bitis arietans) enthält *Adenosin* (Fischer u. Dörfel). Purinbasen haben ein charakteristisches Absorptionsmaximum bei 260 mμ. Das Absorptionsmaximum des Naia-Dialysates liegt aber zwischen 220 und 210 mμ (Abb. 3). Damit ist auch das Vorhandensein von Purinbasen unwahrscheinlich.

Zusammenfassung

1. Die „cardiotoxische", am isolierten Froschherz zu systolischem Stillstand führende Wirkungskomponente des Kobragiftes (Naia nivea) ist zum Teil an kleinmolekulare Stoffe geknüpft, die in das *Dialysat* des Vollgiftes übergehen.

2. Mit Hilfe einer als „Gradientenchromatographie" bezeichneten Rundfiltertechnik läßt das lyophilisierte *Dialysat* sich in 4 Fraktionen auftrennen, die sich mit Ninhydrin und Amidoschwarz anfärben. „Cardiotoxisch" am wirksamsten sind die beiden Fraktionen mit dem größten R_f-Wert, von denen die eine den gesamten *Zink*gehalt des Dialysates enthält (Rotfärbung mit Dithizon).

3. Aber auch aus dem erschöpfend dialysierten *Dialyse-Rückstand* werden durch papierchromatographische Auftrennung 4 Fraktionen gewonnen, deren R_f-Werte mit denjenigen des Dialysates übereinstimmen. Die Fraktion mit dem größten R_f-Wert hat wiederum die größte Herzwirksamkeit und enthält das Zink des Giftes.

4. Das durch *Natriumsulfat*-Fällung aus Vollgift gewonnene und anschließend dialysierte „Cardiotoxin" (Sarkar) verhielt sich wie der

Dialyserückstand: papierchromatographisch ließ es sich in 4 Fraktionen auftrennen, von denen jedoch keine mehr zinkhaltig war.

5. Aus den Versuchsergebnissen wird geschlossen, daß die „cardiotoxische" Wirkung des Kobragiftes nicht verschiedenen Stoffen — kleinmolekularen, dialysablen und großmolekularen, nicht dialysablen — zukommt, sondern wahrscheinlich durch *kleinmolekulare* und deshalb an sich *dialysable* Wirkstoffe verursacht ist, die aber nur zum Teil ins Dialysat übergehen können, weil sie zu einem anderen Teil an Proteine gebunden sind. Diese Bindung läßt sich nicht durch einfache Dialyse, wohl aber durch die angewandte Methode der „Gradienten-Chromatographie" lösen.

6. Versuche mit *Steroidreagentien* und *spektrophotometrische* Untersuchungen gaben keinen Anhaltspunkt dafür, daß den N-haltigen Bestandteilen des Giftes *Steroide* beigemengt sind, wie sie am Aufbau der herzwirksamen Glykoside des „Cardenolid"- und „Bufo"-Typs beteiligt sind.

Wir danken Herrn Professor R. Mertens, Senckenberg-Museum, für Überlassung lebender Naia nivea.

Literatur

Fischer, F. G., u. H. Dörfel: Hoppe-Seyler Z. physiol. Chem. **296**, 232 (1954).
Grassmann, W., u. K. Hannig: Hoppe-Seyler Z. physiol. Chem. **290**, 1 (1952).
Hofmann, H. T.: Naunyn-Schmiedeberg's Arch. exp. Path. Pharmak. **214**, 523 (1952).
Micheel, F., H. Schmitz, G. Bode u. H. Emde: Z. phys. Chem. **266**, 166 (1940).
Neumann, W.: Naturwissenschaften **41**, 322 (1954).
Raudonat, H. W.: Naturwissenschaften **42**, 648 (1955).
Raudonat, H. W.: (1958, in Vorbereitung).
Sarkar, N. K.: J. Indian Chem. Soc. **24**, 227 (1947).
Wellers, G.: Rev. canad. Biol. **8**, 139 (1949).
Wieland, H., u. W. Konz: Sitz.Ber. math.-nat. Abt. bayr. akad. Wiss. **1936**, 177.

Dr. H. W. Raudonat, Pharmakologisches Institut der Universität Frankfurt a. M., Ludwig-Rehn-Str. 14

Arch. exper. Path. u. Pharmakol., Bd. 233, S. 438—467 (1958)

Aus dem Pharmakologischen Institut der Universität Frankfurt a. M.
(Direktor: Prof. Dr. P. Holtz)

Beeinflussung der Narkosedauer durch Hemmung der Cholinesterase des Gehirns*

Von
P. Holtz, H. Balzer und E. Westermann

Mit 6 Textabbildungen

(Eingegangen am 23. November 1957)

In einer voraufgegangenen Arbeit konnten wir zeigen, daß die Blockierung eines auch im Gehirn vorkommenden Fermentes — der *Monoaminoxydase* — durch Iproniacid (Isopropyl-isonicotinsäurehydrazid) die narkotische Wirkung des Evipans und Avertins verkürzt und die cerebralen Wirkungen biogener Amine und Aminosäuren, z. B. des *Serotonins*, des *Dopa* und *5-Hydroxytryptophans*, sowie des Rauwolfiaalkaloids *Reserpin*, an deren Zustandekommen das Freiwerden biogener Amine im Gehirn wesentlich beteiligt zu sein scheint, beeinflußt. So ließ sich z. B. die narkoseverlängernde Wirkung des *Reserpins* durch Vorbehandlung der Versuchstiere mit Iproniacid aufheben, und *5-Hydroxytryptophan*, das bei i.v. Injektion am „Normaltier" die Evipannarkose verlängerte, verkürzte sie am „Iproniacidtier" (Holtz, Balzer, Westermann u. Wezler).

Bei dem Versuch, unter Zuhilfenahme elektrophysiologischer Untersuchungsergebnisse anderer Autoren eine *Lokalisation* des Angriffspunktes der Wirkungen vorzunehmen, war u. a. die Überlegung maßgebend gewesen, daß für die Auswirkung z. B. einer durch Reserpin verursachten Freisetzung biogener Amine im Gehirn oder einer enzymatischen Bildung pharmakologisch aktiven Amins aus einer injizierten, ins Gehirn eindringenden Aminosäure — beispielsweise von 5-Hydroxytryptamin (Serotonin) aus 5-Hydroxytryptophan — neben der verschiedenen pharmakologischen Empfindlichkeit der einzelnen anatomischen Strukturen „die spezifische Topographie des Amingehaltes und der Fermentaktivitäten" von entscheidender Bedeutung sei.

In der vorliegenden Arbeit haben wir untersucht, wie eine Blokkierung der *Cholinesterase* des Gehirns die Narkosedauer beeinflußt und die Wirkungen anderer Pharmaka, des *Reserpins*, *Pervitins* und körpereigener Amine, z. B. des *Serotonins*, *Adrenalins* und *Noradrenalins* auf

* Ausgeführt mit Unterstützung der Deutschen Forschungsgemeinschaft.

die Narkosedauer modifiziert. Da angenommen werden darf, daß die Erregungsübertragung auch an cerebralen Synapsen wenigstens zum Teil durch *Acetylcholin* vermittelt wird, also cholinergischer Natur ist, waren von einer Hemmung des acetylcholinabbauenden Fermentes durch Anticholinesterasen charakteristische Wirkungen zu erwarten. Als Cholinesterasehemmer (ChEH) verwendeten wir *Physostigmin* (Eserin) und *Mintacol* (E 600; Paraoxon; p-Nitrophenyl-diaethylphosphat), von denen bekannt ist, daß sie — im Gegensatz z. B. zu der quaternären Ammoniumbase *Prostigmin* (Neostigmin) — wegen ihrer Lipoidlöslichkeit leicht auch ins Gehirn eindringen.

Methoden

Versuchstiere waren, wie in der früheren Arbeit (Holtz, Balzer, Westermann, Wezler), männliche weiße Mäuse im Gewicht von 16 –22 g. Gruppen von je 5 gleichschweren Tieren, die bei konstanter Raumtemperatur (26° C) *einzeln* in 3 l-Gläsern (Boden mit Sägespänen bedeckt) gehalten wurden, erhielten 50—100 mg/kg *Evipannatrium* (Cyclohexenyl-methyl-N-methylbarbitursaures Natrium) bzw. 200—300 mg/kg *Avertin* (0,1 ml/10 g) intraperitoneal, die jeweils gleiche Anzahl von Tieren vorher (die Zeiten sind in den Tabellen angegeben) 0,02 –0,5 mg/kg Physostigminsalizylat bzw. Mintacol („E 600; Paraoxon; p-Nitrophenyl-diaethyl-phosphat) subcutan oder i.m., *Reserpin* (Reserpin-Ascorbinsäure mit 10% Reserpingehalt), *Serotonin* (5-Oxytryptamin-kreatininsulfat), *Noradrenalin* und *Adrenalin* als Arterenol- bzw. Suprarenin-HCl (auf Base berechnet) subcutan. Die Wirkung des Narkoticums galt als abgeklungen, wenn die Tiere keine passive Seitenlage mehr ertrugen. Dieser Zeitpunkt wurde dadurch ermittelt, daß wenigstens alle 5 min daraufhin geprüft wurde. Der Zeitpunkt der *Injektion des Narkoticums* wird als Narkosebeginn angenommen, so daß das bei den einzelnen Tieren oft verschieden lange Excitationsstadium mit in die „Narkosedauer" eingeht. — Durch diese Versuchsanordnung gelang es in vielen Versuchen, die Streuung innerhalb der einzelnen Versuchsgruppen sehr gering zu halten ($\sigma = 1{,}5$—$3{,}0$), so daß auch bei kleinen Mittelwert-Differenzen zwischen 2 Gruppen diese statistisch signifikant sein konnten. Da die Narkosedauer nach der gleichen Evipan- bzw. Avertindosis an verschiedenen Tagen und zu verschiedenen Tageszeiten sehr verschieden sein konnte, wurden in jeder Versuchsserie Kontrollgruppen angesetzt, die nur das Narkoticum bzw. Narkoticum + Cholinesterasehemmer erhielten. *Direkt miteinander vergleichbar sind deshalb nur die innerhalb ein* und *desselben Versuchsansatzes („Vers.-Nr." der Tabellen) ermittelten Zahlenwerte.* Die Ergebnisse (Änderungen der Narkosedauer) wurden mit Hilfe des t-Testes (P-Wert) statistisch gesichert. Die Versuchstiere kamen nur einmal in den Versuch.

Die Bestimmung der *Cholinesteraseaktivität* des Gehirns erfolgte nach der von Ammon angegebenen Methode in der Warburg-Apparatur. Je 1,0 ml Gehirnhomogenat 1 : 10 in Bicarbonat-Ringerlösung (0,7% NaCl, 0,03% KCl, 0,3% $NaHCO_3$) wurde mit 5 mg Acetylcholinchlorid in 0,2 ml Aqua dest. geschüttelt, und das freiwerdende CO_2 manometrisch gemessen. N_2-Atmosphäre; 37° C; Schüttelgeschwindigkeit: 80 je Minute.

Zur Bestimmung der *Monoaminoxydase-aktivität* von Gehirn und Leber wurden die Organe von je 3 Mäusen mit der 4fachen Menge m/15 Phosphatpuffer p_H 7,4 homogenisiert, 10 min lang mit 40000 × g zentrifugiert, die überstehende Lösung abgegossen und das Sediment 1:2 mit m/15 Na-Phosphatpuffer p_H 7,4 aufgeschwemmt (*Homogenat*). *Warburg-Apparatur:* Manometrische Messung des

O_2-Verbrauchs. *Versuchsansätze:* Je 1,0 ml Homogenat + 0,15 ml Semicarbacid (m/10) + 0,15 ml NaCN (m/50) im Hauptraum. Im Einsatz 0,2 ml KOH — NaCN. Im Anhang 5 mg Tyramin-HCl in 0,2 ml Aqua dest. — O_2-Atmosphäre; 37° C.

Blutdruckversuche. Ratten (180—250 g) wurden mit Urethan (1,2—1,5 g/kg) bzw. Avertin (insgesamt 500—700 mg/kg) oder Evipannatrium (insgesamt 200 bis 300 mg/kg) narkotisiert. Die Blutdruckregistrierung erfolgte mit Hilfe eines Hg-Manometers bzw. eines Membranmanometers in der A. carotis. i.v. Injektionen in die V. jugularis. In einem Teil der Versuche wurden die Tiere künstlich beatmet.

An *Mäusen* in Urethannarkose (1,5—2,0 g/kg) bzw. Avertinnarkose (500 mg/kg) i.p. wurde der Blutdruck aus einem in die A. carotis eingeführten Polyäthylen-Katheter mit Hilfe eines Stathamelementes (0—750 mm Hg; 12 Volt max.) über ein schnell schwingendes Spiegelgalvanometer ($3{,}3 \cdot 10^{-7}$ Amp.; 95 Hz) photokymographisch registriert. Vor dem Versuch erhielten die Tiere zur Verhinderung der Blutgerinnung 20 mg/kg Vetren in die Schwanzvene, in die auch die anderen Injektionen erfolgten.

Versuche

1. Die Beeinflussung der Evipan- und Avertinnarkose durch Physostigmin und Mintacol

a) Abhängigkeit der Wirkung von der Dosis. Verabfolgt man weißen Mäusen 5—10 min vor *Evipan* (75 mg/kg i.p.), das in dem Versuch der Tab. 1, Vers. Nr. 1 eine 29,2 min dauernde Narkose verursacht, eine subcutane Injektion von *Physostigmin*, so führt die kleinere Dosis von 0,1 mg/kg zu einer signifikanten *Verkürzung*, die größere Dosis von 0,5 mg/kg zu einer — allerdings nicht signifikanten — *Verlängerung* der Narkosedauer. Die narkoseverlängernde Wirkung einer größeren Physostigmindosis wird signifikant, wenn man den Versuch, anstatt mit 75 mg/kg, mit 50 mg/kg Evipan durchführt: die jetzt nur 6,8 min anhaltende Narkose der Kontrolltiere wird durch 0,2 mg/kg Physostigmin signifikant verlängert (Tab. 1, Vers. Nr. 2). — Die dosisabhängige, gegensätzliche Wirkung des Cholinesterasehemmers wird noch deutlicher in Versuchen mit *Mintacol:* 0,02 mg/kg *verkürzen* die Narkosedauer ebenso signifikant, wie 0,5 mg/kg sie *verlängern* (Tab. 1, Vers. Nr. 3). Die mittlere Dosis von 0,1 mg/kg führt zu keiner signifikanten Veränderung.

Die *Avertin*narkose wird ebenfalls durch kleine Physostigmin- und Mintacoldosen *verkürzt*, durch größere *verlängert* (Tab. 1, Vers. Nr. 4—6). Auch hier gibt es einen von Versuch zu Versuch schwankenden Bereich mittelgroßer Dosen, in dem die Narkosedauer weder signifikant verkürzt nocht verlängert ist (siehe z. B. Tab. 1, Vers. Nr.6, Gruppe III). — Die Wirkung der Cholinesterasehemmer setzt sich demnach aus zwei Komponenten zusammen, einer narkoseverkürzenden und einer narkoseverlängernden, die sich bei einem bestimmten Wirksamkeitsverhältnis der beiden Komponenten, wie es dem mittleren Dosierungsbereich zukommt, gegenseitig aufheben.

Wenn auch die in der Warburg-Apparatur bestimmte *Cholinesteraseaktivität* der Gehirnhomogenate nach intramuskulärer Injektion von

Tabelle 1. *Beeinflussung der Evipan- und Avertinnarkose durch Cholinesterasehemmer. Abhängigkeit von der Dosis*
Kontrolltiere: 50—75 mg/kg Evipannatrium bzw. 200—300 mg/kg Avertin i.p. — *Versuchstiere:* 5—10 min vorher Physostigmin bzw. Mintacol s.c.

Vers. Nr.	Gruppe	Dosis mg/kg		Mittlere Narkosedauer		
				Minuten	Differenz %	P-Wert
1	I	75,0	Evipan	29,2	—	—
	II	0,02	+ Physostigmin	22,0	II:I = — 24	< 0,3
	III	0,1	+ Physostigmin	11,0	III:I = — 63	< 0,02
	IV	0,5	+ Physostigmin	35,6	IV:I = + 22	< 0,5
2	I	50,0	Evipan	6,8	—	—
	II	0,2	+ Physostigmin	17,2	II:I = +150	< 0,05
3	I	75,0	Evipan	30,4	—	—
	II	0,02	+ Mintacol	16,2	II:I = — 47	< 0,01
	III	0,1	+ Mintacol	21,2	III:I = — 30	< 0,1
	IV	0,5	+ Mintacol	44,8	IV:I = + 48	< 0,01
4	I	300,0	Avertin	18,8	—	—
	II	0,1	+ Physostigmin	12,2	II:I = — 35	< 0,01
	III	0,5	+ Physostigmin	29,6	III:I = + 57	< 0,001
5	I	200,0	Avertin	13,4	—	—
	II	0,5	+ Physostigmin	36,4	II:I = +172	< 0,001
6	I	300,0	Avertin	18,8	—	—
	II	0,02	+ Mintacol	15,2	II:I = — 19	< 0,05
	III	0,1	+ Mintacol	16,8	III:I = — 11	< 0,3
	IV	0,5	+ Mintacol	27,6	IV:I = + 47	< 0,01

Tabelle 2. *Hemmung der Cholinesteraseaktivität des Gehirns durch i.m. Injektion von Mintacol*
Je 2 weiße Mäuse (20—22 g) erhielten 0,1 mg, 0,2 mg bzw. 0,5 mg/kg Mintacol i.m. (je 0,1 ml/20 g). 15 min nach der Injektion wurden die Tiere durch Dekapitation getötet, die Gehirne einzeln homogenisiert und die Cholinesteraseaktivität der Homogenate in der Warburg-Apparatur bestimmt (siehe Methodik). Die Werte der Spontanhydrolyse im Puffer sind in Abzug gebracht.

Tier	Mintacoldosis mg/kg	Cholinesteraseaktivität		
		mm^3 CO_2/30 min		%Aktivität
I	—	264	270	100
II	—	276		
I	0,1	231	233	87
II	0,1	235		
I	0,2	203	199	73
II	0,2	195		
I	0,5	43	53	20
II	0,5	63		

0,1 mg/kg Mintacol viel schwächer gehemmt ist als nach der Injektion von 0,5 mg/kg (Tab. 2), so dürfte das nicht die Ursache für die gerade entgegengesetzte *Wirkung* der kleineren und größeren Dosen sein (siehe Tab. 1, Vers. Nr. 3), wie die folgenden Versuche zeigen.

b) Abhängigkeit der Wirkung vom zeitlichen Abstand der Injektionen. 0,5 mg/kg Mintacol i. m., die zu Narkose*verlängerung* führen, wenn man sie 5 min vor dem Narkoticum injiziert, *verkürzen* die Narkosedauer, wenn man sie 30 min oder 2—22—40 Std vorher injiziert (Tab. 3). Wie vorher die gegensätzliche Wirkung kleiner und großer Dosen der Cholinesterasehemmer, so kann jetzt die entgegengesetzte Wirkung

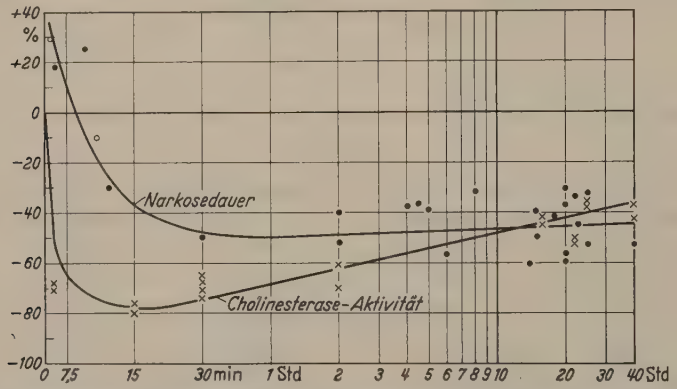


Abb. 1. *Beeinflussung der Narkosedauer und Cholinesteraseaktivität des Gehirns durch Mintacol. (Prozentuale Abweichung von den Kontrollwerten.) Narkosedauer*: Bestimmung an Gruppen von je 5 weißen Mäusen. — *Kontrolltiere:* 60—80 mg/kg Evipannatrium i.p. — *Versuchstiere:* 5 min bis 40 Std vor Evipan je 0,5 mg/kg Mintacol i.m. — *Cholinesteraseaktivität:* Je 2 weiße Mäuse. Kontroll- und Versuchstiere wie oben. Bestimmung der Fermentaktivität im Homogenat der einzelnen Gehirne (siehe Methodik). • signifikant, o nicht signifikant

ein und derselben Mintacoldosis nicht durch eine verschieden starke Hemmung der Cholinesterase bedingt sein, da die Fermentaktivität nach 5 min, 30 min und 2 Std fast gleichstark gehemmt ist (Tab. 3 u. Abb. 1).

Die Narkoseverlängerung von 38,8 auf 45,4 min = + 17% (siehe Tab. 3, Vers. Nr. 1, Gruppe II) durch das 5 min vor Evipan injizierte Mintacol ist nicht groß, aber hochsignifikant. Stärkere Verlängerungen ließen sich, wie die in der Tab. 1 dargestellten Versuche Nr. 2, 4, 5 und 6 zeigten, durch die Anwendung kleinerer Narkoticumdosen bei dementsprechend kürzerer Narkose der Kontrolltiere erzielen. Im Versuch Nr. 3 der Tab. 3 haben wir versucht, durch noch weitere Verkürzung des zeitlichen Abstandes zwischen Mintacol- und Evipaninjektion eine stärkere Narkoseverlängerung zu erhalten: das 2 min vor Evipan injizierte Mintacol (Vers. Nr. 3, Gruppe II) führt zwar zu einer im Mittel etwas stärkeren Verlängerung der Narkose (+ 29%) als das 5 min vor Evipan injizierte (+ 17%), diese ist jetzt aber nicht mehr signifikant, d. h. die Streuung der Einzelergebnisse sehr groß, indem es bei einigen Tieren *noch* zu einer Verlängerung, bei anderen jedoch *schon* zu einer Verkürzung der Narkosedauer kam.

Tabelle 3. *Beeinflussung der Narkosedauer und der Cholinesteraseaktivität des Gehirns durch Mintacol. Abhängigkeit von der Einwirkungszeit*

Kontrolltiere: 75 mg/kg (im Versuch Nr. 2 85 mg/kg) Evipannatrium i.p. *Versuchstiere:* 5 min bis 40 Std vorher 0,5 mg/kg Mintacol i.m. Zu verschiedenen Zeiten nach der Mintacolinjektion wurden je 2 weitere Tiere durch Dekapitation getötet und die Cholinesteraseaktivität der einzelnen Gehirne in der Warburg-Apparatur bestimmt (siehe Methodik)

Vers. Nr.	Gruppe	Zeit nach Mintacol-injektion	Mittlere Narkosedauer			Cholinesteraseaktivität	
			Minuten	Differenz %	P-Wert	mm^3 CO_2/30 min	% Aktivität
1	I	—	* 38,8	—	—	262 , 274	100 , 100
	II	5 min	** 45,4	II:I = + 17	< 0,001	84 , 86	32 , 31
	III	30 min	19,8	III:I = — 49	< 0,001	89 , 92	34 , 33
	IV	2 Std	23,4	IV:I = — 40	< 0,001	79 , 107	30 , 39
	V	22 Std	21,2	V:I = — 45	< 0,001	126 , 135	48 , 49
2	I	—	57,8	—	—	236 , 250	100 , 100
	II	16 Std	34,8	II:I = — 40	< 0,001	131 , 146	55 , 58
	III	25 Std	38,0	III:I = — 34	< 0,001	151 , 160	64 , 64
	IV	40 Std	27,0	IV:I = — 53	< 0,001	135 , 158	57 , 63
3	I	—	35,8	—	—		
	II	2 min	46,4	II:I = + 29	< 0,1		
	III	2 Std	17,4	III:I = — 51	< 0,001		
	IV	4 Std	22,0	IV:I = — 39	< 0,001		
	V	8 Std	22,4	V:I = — 37	< 0,001		
Ergebnis eines 2. Versuchses:			* 34,0 ** 43,6	*:** = + 28	< 0,02		

c) Die Ursache der unterschiedlichen Wirkung bei gleichstarker Cholinesterase-Hemmung. *Kleine* Mintacoldosen (0,02—0,1 mg/kg), kurz vor dem Narkoticum injiziert, verkürzten die Narkosedauer; *große* Dosen (0,5 mg/kg) verlängerten sie. Aber auch die großen Dosen wirkten narkose*verkürzend*, wenn sie 30 min bis 40 Std vor dem Narkoticum injiziert wurden. Da die *Hemmung* der *Cholinesteraseaktivität* des Gehirns in allen Fällen ungefähr gleichstark ist, kann diese zwar die Ursache für die narkose*verkürzende* Wirkung der Cholinesterasehemmer sein, nicht aber für die Narkose*verlängerung*, die nach größeren Dosen auftritt, wenn man diese 5—10 min vor dem Narkoticum injiziert. Während der ersten 30 min nach der i.m. oder subcutanen Injektion von 0,5 mg/kg Physostigmin bzw. Mintacol muß sich deshalb etwas ereignen, das die durch Hemmung der Cholinesterase verursachte Narkose*verkürzung* in eine Narkose*verlängerung* umwandelt, dann wirkungsmäßig abklingt —, und sich nicht ereignet, wenn man nur 0,1 mg/kg Physostigmin oder Mintacol injiziert.

Hemmung der Cholinesteraseaktivität bedeutet, wie in der Peripherie, so auch im Gehirn, Potenzierung der *Acetylcholin*wirkung. Wenn diese die Ursache für die Narkose*verkürzung* ist, liegt es nahe, die unter bestimmten Bedingungen durch Cholinesterasehemmer hervorgerufene Narkose*verlängerung* auf eine Mitbeteiligung von antagonistisch wirkenden Sympathicusstoffen — Noradrenalin, Adrenalin — zurückzuführen.

Noradrenalin und *Adrenalin*, die bei kürzerer Narkosedauer diese nur wenig beeinflussen, verursachen eine signifikante *Verlängerung* bei Tieren, die mit an sich narkose*verkürzenden* Physostigmin- oder Mintacoldosen vorbehandelt sind (Tab. 4, Vers. Nr. 1—4). Die sonst bei subcutaner Injektion nur schwach wirksamen Sympathicusstoffe wirken demnach narkoseverlängernd, wenn die Cholinesterase gehemmt ist. Bei längerer Narkosedauer (höhere Evipandosis) kann, wie z. B. im Vers. 5 und 6 der Tab. 4, *Adrenalin* signifikant verkürzend, *Noradrenalin* verlängernd wirken. Man gewinnt den Eindruck, daß bei nicht gehemmter Cholinesterase *Noradrenalin* verlängernd, *Adrenalin* verkürzend wirkt, und daß bei gehemmter Cholinesterase beide Sympathicusstoffe die Narkose verlängern.

Anders verhält sich *Pervitin* (Phenyl-methylamino-propan-hydrochlorid). 0,5 mg/kg führen, ebenso wie 0,1 mg/kg *Physostigmin*, zu einer geringfügigen — nicht signifikanten — Verkürzung der Evipannarkose (Tab. 5). Beide zusammen verursachen eine starke, signifikante Abnahme der Narkosedauer (Tab. 5, Gruppe IV und VI).

Der am *Normaltier* bestehende Unterschied zwischen der Adrenalin- und Noradrenalinwirkung wird deutlicher, wenn man in eine abklingende Evipannarkose hinein — kurz nachdem keine Seitenlage mehr ertragen wird — die beiden Sympathicusstoffe subcutan injiziert. Nach *Noradrenalin* geraten die erwachten Tiere dann wieder in Narkose, nach *Adrenalin* nicht (Tab. 6).

Tabelle 4. *Beeinflussung der Narkosedauer durch Adrenalin und Noradrenalin* Gruppen von je 5 weißen Mäusen. — *Kontrolltiere:* 50—75 mg/kg Evipannatrium i.p. — *Versuchstiere:* Physostigmin, Adrenalin bzw. Noradrenalin s.c. 5—10 min vor Evipan. Mintacol i.m. 6 Std vor Evipan

Vers. Nr.	Gruppe	Dosis mg/kg		Mittlere Narkosedauer		
				Minuten	Differenz %	P-Wert
1	I	50,0	Evipan	9,0	—	—
	II	0,2	+ Physostigmin	7,4	II: I = − 18	< 0,8
	III	0,5	+ Noradrenalin	10,6	III: I = + 17	< 0,7
	IV	0,2 + 0,5	Physostigmin + Noradrenalin	27,6	IV: I = +206	< 0,01
					IV: II = +272	< 0,01
					IV:III = +160	< 0,01
2	I	50,0	Evipan	18,4	—	—
	II	0,1	+ Physostigmin	9,0	II: I = − 51	< 0,05
	III	1,0	+ Noradrenalin	22,6	III: I = + 22	< 0,01
	IV	0,1 + 1,0	Physostigmin + Noradrenalin	29,6	IV: I = + 61	< 0,02
					IV: II = +229	< 0,01
					IV:III = + 31	< 0,02
3	I	50,0	Evipan	16,4	—	—
	II	0,1	+ Physostigmin	11,8	II: I = − 28	< 0,05
	III	1,0	+ Adrenalin	19,6	III: I = + 19	< 0,5
	IV	0,1 + 1,0	Physostigmin + Adrenalin	32,2	IV: I = + 96	< 0,001
					IV: II = +173	< 0,001
					IV:III = + 64	< 0,02
4	I	50,0	Evipan	11,2	—	—
	II	0,5	+ Mintacol	2,6	II: I = − 77	< 0,001
	III	1,0	+ Noradrenalin	17,0	III: I = + 52	< 0,01
	IV	1,0	+ Adrenalin	11,2	IV: I = ± 0	< 0,9
	V	0,5 + 1,0	Mintacol + Noradrenalin	24,4	V: I = +118	< 0,001
					V: II = +840	< 0,001
					V:III = + 43	< 0,01
	VI	0,5 + 1,0	Mintacol + Adrenalin	17,2	VI: I = + 54	< 0,001
					VI: II = +560	< 0,001
					VI: IV = + 54	< 0,01
5	I	85,0	Evipan	38,0	—	—
	II	1,0	+ Adrenalin	21,4	II: I = − 44	< 0,001
	III	1,0	+ Noradrenalin	48,8	III: I = + 29	< 0,02
6	I	75,0	Evipan	28,6	—	—
	II	1,0	+ Adrenalin	21,6	II: I = − 25	< 0,001
	III	1,0	+ Noradrenalin	27,6	III: I = − 4	< 0,4

Das scheint im Widerspruch zu Versuchsergebnissen von Lamson u. Mitarb. zu stehen, die den Wiedereintritt der Narkose auch mit Adrenalin erzielten. Diese Autoren injizierten jedoch Adrenalin *i.v.* in einer Dosierung (1 mg/kg), die sich an unseren Tieren bei der gleichen Injektionsart als ausnahmslos *tödlich* erwies.

Die ursächliche Mitbeteiligung von Sympathicusstoffen am Zustandekommen der Narkoseverlängerung, die nach hohen, kurz vor dem

Narkoticum injizierten Physostigmin- oder Mintacoldosen auftritt, wird auch durch *Blutdruckversuche an Ratten* wahrscheinlich.

Es ist bekannt, daß Eserin und andere Cholinesterasehemmer, die leicht ins Zentralnervensystem eindringen, anstatt der zu erwartenden peripher-muscarinartigen Blutdruck*senkung* eine Blutdruck*steigerung* verursachen können. Diese tritt mit besonderer Regelmäßigkeit bei *Ratten* auf; *Ganglienblocker* und *Sympathicolytica*

Tabelle 5. *Beeinflussung der Narkose durch Pervitin und Physostigmin* Gruppen von je 5 weißen Mäusen. — *Kontrolltiere:* 100 mg/kg Evipannatrium i.p.— *Versuchstiere:* Physostigmin s.c. bzw. Pervitin s.c. 10 min vor Evipan.

Gruppe	Dosis mg/kg		Mittlere Narkosedauer		
			Minuten	Differenz %	P-Wert
I	100,0	Evipan	62,4	—	—
II	0,5	+ Pervitin	52,8	II:I = — 15	< 0,1
III	0,1	+ Physostigmin	57,2	III:I = — 8	< 0,1
IV	0,5 + 0,1	Pervitin + Physostigmin	39,2	IV:I = — 37	< 0,001
				IV:II = — 26	< 0,02
				IV:III = — 31	< 0,001
V	0,2	+ Physostigmin	48,2	V:I = — 23	< 0,001
VI	0,5 + 0,2	Pervitin + Physostigmin	28,4	VI:I = — 55	< 0,001
				VI:II = — 46	< 0,01
				VI:V = — 41	< 0,001

Tabelle 6. *Wirkung von Adrenalin, Noradrenalin und Mintacol im postnarkotischen Stadium*

Gruppen von je 5 weißen Mäusen erhielten 50 mg/kg Evipannatrium i.p. — Nach dem Erwachen (Aufrichten aus passiver Seitenlage im Mittel nach 17,6 min) wurde Adrenalin, Noradrenalin (je 1 mg/kg s.c.) bzw. Mintacol (0,5 mg/kg i.m.;* 0,25 mg je kg i.v.) injiziert. — Die Zahlen bedeuten Dauer in Minuten der wiedereingetretenen Narkose (Ertragen passiver Seitenlage).

Adrenalin	Noradrenalin	Mintacol
0,0,4,0,0	8,9,6,12,9	11,13*,14,0,10

wirken hemmend, *Cocain* verstärkend. Auch *Prostigmin*, das als wenig lipoidlösliche quaternäre Stickstoffverbindung nur schwer ins Zentralnervensystem eindringt und bei i.v. Injektion blutdrucksenkend wirkt, verursacht wie Eserin Blutdrucksteigerung, wenn man es intracisternal injiziert. *Atropin* schwächt die pressorische Wirkung ab. (Dirnhuber u. Cullumbine; Varagic; Hornkiewicz u. Kobinger. Hier auch die ältere Literatur.) All das spricht für einen überwiegend zentralen Angriffspunkt der Wirkung: die zentrale Auslösung von Impulsen, die nach Passieren peripherer Ganglien sich adrenergisch auswirken.

An der mit Urethan oder Avertin narkotisierten *Ratte* hat eine kleine Dosis *Mintacol* (0,1 mg/kg i.m.), die bei *Mäusen* die Narkose verkürzt, keine Blutdruckwirkung; eine große Dosis (0,5 mg/kg), die bei Mäusen die Narkosedauer verlängert, verursacht eine starke Blutdrucksteigerung, die 10—25 min andauert (Abb. 2a). Bei *Katzen* führt Physostigmin zu einer 10—15fachen Erhöhung der Adrenalinsekretion aus den

Nebennieren (Stewart u. Rogoff). Die bei der *Ratte* nach Mintacol auftretende Blutdrucksteigerung beruht aber nicht ausschließlich auf einer Adrenalinausschüttung aus dem Nebennierenmark, da sie auch am adrenalektomierten Tier auftritt (Abb. 2b). — Auch bei *Mäusen* wirkt Mintacol blutdrucksteigernd (Abb. 2c).

Die *Ursache* dafür, daß die Narkosedauer durch größere Physostigmin- und Mintacoldosen verlängert wird, wenn diese kurz vor dem Narkoticum

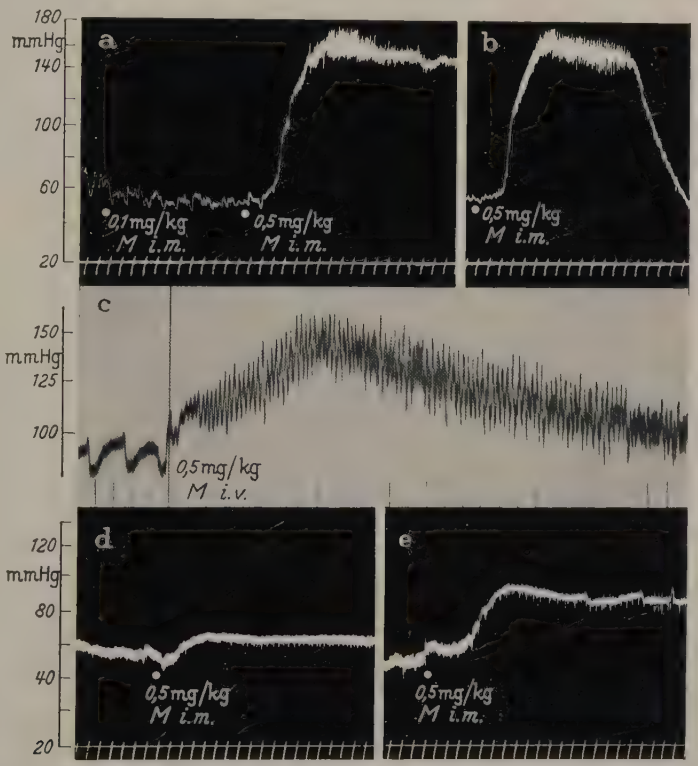


Abb. 2. *Blutdruckwirkung von Mintacol in Avertin- und Evipannarkose* a *Ratte* (180 g) Avertinnarkose. — b *Ratte* (200 g) Avertinnarkose (20 min vor Mintacolinjektion Nebennieren extirpiert). — c *Maus* (23 g) Avertinnarkose (Zeitschreibung 10 sec). — d und e *Ratten* (je 180 g) Evipannarkose (siehe Methodik). — *M* Mintacol — Zeitschreibung in a, b, d und e: 1 min

injiziert werden, jedoch verkürzt wird, wenn die Injektion längere Zeit vor derjenigen des Narkoticums erfolgt, obwohl in beiden Fällen die Cholinesteraseaktivität des Gehirns etwa gleichstark gehemmt ist (siehe Tab. 3), liegt demnach offensichtlich darin, daß im ersten Fall die an sich zu Narkoseverkürzung führende Hemmung der Fermentaktivität durch die Freisetzung bzw. das Wirksamwerden von Sympathicusstoffen sozusagen gegenregulatorisch überlagert und die Narkoseverkürzung in eine Narkoseverlängerung umgewandelt wird, wie das auch bei der

subcutanen Injektion der Sympathicusstoffe der Fall war (vgl. Tab. 4, Vers. Nr. 1—4). Da die mit Blutdrucksteigerung verbundene, narkoseverlängernde „adrenergische bzw. noradrenergische Phase" der Gesamtreaktion eher (nach 5—25 min) abklingt als die tagelang anhaltende, narkoseverkürzende „cholinergische Phase" der Cholinesterasehemmung, wirken auch die *hohen* Dosen der Cholinesterasehemmer narkose*verkürzend*, wenn sie mindestens 30 min vor dem Narkoticum injiziert werden. Die Abb. 1 stellt die zeitlichen Beziehungen zwischen Hemmung der Cholinesterase des Gehirns und Art der Narkosebeeinflussung — ob verlängernd oder verkürzend — dar.

Die oben gegebene Deutung erhält durch Vergleichsversuche mit *Avertin* und *Evipan* als Narkotica eine weitere Stütze. — In dem Versuch der Tab. 7 wurden Gruppen weißer Mäuse mit Avertin bzw.

Tabelle 7. *Beeinflussung der Narkosedauer durch Hemmung der Cholinesterase während der Narkose*

Gruppen von je 5 weißen Mäusen. — *Kontrolltiere:* 75 mg/kg Evipannatrium bzw. 300 mg/kg Avertin i.p. — *Versuchstiere:* 0,5 mg/kg Mintacol i.m. 5 min *nach* Injektion des Narkoticums

Vers. Nr.	Gruppe	Dosis mg/kg		Mittlere Narkosedauer		
				Minuten	Differenz %	P-Wert
1	I	75,0	Evipan	28,0	—	—
	II	75,0 0,5	+ Evipan Mintacol	14,6	II:I = —48	< 0,001
2	I	300,0	Avertin	39,4	—	—
	II	300,0 0,5	+ Avertin Mintacol	51,4	II:I = +31	< 0,01

mit Evipan narkotisiert. 5 min *nach* der intraperitonealen Injektion des Narkoticums, als die Tiere schon Seiten- und Rückenlage ertrugen, erhielten sie eine i.m. Injektion von 0,5 mg/kg Mintacol. Die *Avertin*narkose wurde erwartungsgemäß verlängert, die *Evipan*narkose aber signifikant verkürzt. Die Erklärung ist, daß Evipan die in Avertinnarkose — und in Urethannarkose — nach höheren Physostigmin- bzw. Mintacoldosen zustande kommende blutdrucksteigernde „adrenergische Reaktion" weitgehend verhindert, wie schon von Schaumann mitgeteilt wurde: die durch 0,5 mg/kg Mintacol i.m. bei „*Avertin*ratten" verursachte Blutdrucksteigerung (siehe Abb. 2a und b) bleibt bei mit *Evipan* narkotisierten Ratten aus oder ist nur schwach ausgebildet (Abb. 2c und d).

Das steht nicht in Widerspruch mit den in Tab. 1 dargestellten Ergebnissen, daß auch die *Evipan*narkose durch 0,5 mg/kg Mintacol *verlängert* wird. In diesen Versuchen wurde Mintacol *vor* Evipan injiziert und hatte Zeit, vor Applikation des Narkoticums die blutdrucksteigernde, narkoseverlängernde „adrenergische Reaktion" auszulösen. In den Versuchen der Tab. 7 wurde Mintacol erst *nach* Evipan injiziert und konnte, wie in den Blutdruckversuchen der Abb. 3, die

blutdrucksteigernde, narkose*verlängernde* „adrenergische Reaktion" nicht mehr auslösen. Deshalb kam in diesem Fall lediglich die reine narkose*verkürzende* Wirkung der Cholinesterasehemmung zur Geltung.

Bei *Meerschweinchen* schließlich, bei denen Mintacol (0,2, 0,5 und 1 mg/kg i.m.) den Blutdruck entweder unverändert ließ oder ihn — umgekehrt wie bei Ratten — senkte, wirkte auch der *kurz* vor Evipan injizierte Cholinesterasehemmer nicht narkoseverlängernd, sondern verkürzend (Tab. 8).

Tabelle 8. *Beeinflussung der Narkosedauer durch Mintacol bei Meerschweinchen* Meerschweinchen erhielten 20 mg/kg Evipannatrium i.p. bzw. 12 min vor Evipan 0,5 mg/kg Mintacol i.m.

Tier Nr.	Tiergewicht		Narkosedauer in Minuten
1	480	Evipan	29
2	290	Evipan	35
3	390	Evipan + Mintacol	17
4	440	Evipan + Mintacol	13

Im Gegensatz hierzu fanden Frommel u. Mitarb., daß *Neostigmin* (Dimethylcarbaminsäureester des m-Hydroxyphenyltrimethyl-ammoniumbromids) bei Meerschweinchen und Kaninchen die Somnifen- bzw. Narconumalwirkung verstärkt. Es erscheint aber zweifelhaft, ob es sich hierbei überhaupt um eine *zentrale* Wirkung des Cholinesterasehemmers handelte, da Neostigmin als quaternäre Ammoniumbase kaum ins Zentralnervensystem eindringt, und andererseits die Versuchstiere auf die angewandten Dosen mit starken peripheren Erscheinungen (muskuläre Zuckungen) reagierten. Demgegenüber verursachte die höchste, in unseren Versuchen angewandte Mintacoldosis (0,5 mg/kg) bei Mäusen und Meerschweinchen keinerlei wahrnehmbare periphere Wirkung.

2. Beeinflussung der Toxicität des Mintacols durch Evipan

In *Urethan-* oder *Avertin*narkose reagierten Ratten auf die Injektion von 0,5 mg/kg Mintacol mit einer starken Blutdrucksteigerung; in *Evipan*narkose blieb diese aus oder war nur schwach (vgl. Abb. 2a, c, d). Bei diesen Versuchen fiel auf, daß eine zweite Injektion der gleichen Mintacoldosis für die mit Urethan oder Avertin narkotisierten Tiere meistens tödlich war, von den mit Evipan narkotisierten Tieren jedoch überstanden wurde.

An Ratten und Mäusen haben wir untersucht, wie die *tödliche* Mintacoldosis durch Evipan beeinflußt wird. Absolut tödlich für *Ratten* waren 0,5 mg/kg, für *Mäuse* 1,0 mg/kg Mintacol i.m. Die Tiere starben 10 bis 20 min nach der Injektion. Aus der Tab. 9 ist zu ersehen, daß *Evipan*, im Anschluß an die i.m. Injektion von Mintacol intraperitoneal injiziert, sämtliche Tiere vor der sonst tödlichen Wirkung schützt.

Diese Schutzwirkung des *Evipans* reicht bei weitem nicht an diejenige des *Atropins* heran. Nach Vorbehandlung mit z. B. 10 mg/kg Atropin. sulf. wird von Mäusen die *4fach* tödliche Mintacoldosis (4 mg/kg i.m.)

überstanden (siehe hierzu auch Wirth). Bei zusätzlicher Verabfolgung von Evipan wird auch die 5fach tödliche Dosis Mintacol, an der sonst die nur mit Atropin behandelten Tiere sämtlich sterben, von allen Tieren überlebt (Versuchsergebnisse an Gruppen von je 3 Tieren).

Zur Unterdrückung der durch die Cholinesterasehemmer ausgelösten *peripheren* muscarinartigen Wirkungen würden viel kleinere Atropindosen (0,1—1 mg/kg) genügen. Die Dosis von 1 mg/kg Atropin war aber nur in der Lage, vor der tödlichen Wirkung der doppelten Dosis letalis von Mintacol zu schützen. Die stärkere

Tabelle 9. *Beeinflussung der Toxicität des Mintacols durch Evipan*
Gruppen weißer Mäuse (17—21 g) und Ratten (95—115 g) erhielten 0,5—2,0 mg/kg Mintacol i.m., ein Teil der Tiere gleich anschließend 100—125 mg/kg Evipannatrium i.p.

Tierart	Anzahl der Tiere	Mintacol mg/kg	Evipan mg/kg	gestorben	überlebend
Mäuse	6	—	100	0	6
	6	0,5	—	0	6
	6	1,0	—	6	0
	6	1,0	100	0	6
	6	2,0	100	6	0
Ratten	4	—	125	0	4
	4	0,5	—	4	0
	5	0,5	125	0	5

Schutzwirkung von 10 mg/kg Atropin spricht deshalb dafür, daß der tödliche Ausgang der Vergiftung wesentlich durch die *zentralen* Wirkungen der Cholinesterasehemmer mitverursacht ist, und daß auch diese sich durch Atropin, wenn man hoch dosiert, bis zu einem gewissen Grade unterdrücken lassen. Erdmann u. Lendle konnten zeigen, daß sich die tödliche Mintacoldosis für *Meerschweinchen* bei i.v. Infusion durch Vorbehandlung mit *großen* Atropindosen stärker erhöhte als durch Vorbehandlung mit *kleineren* Atropindosen.

So läßt sich auch die durch Mintacol zentral ausgelöste *Blutdrucksteigerung* an der *Ratte* (Abb. 3a) durch 10 mg/kg Atropin, das 30 min vorher i.m. injiziert wurde, abschwächen, wenn auch nicht ganz verhindern (Abb. 3b). Auch *Hexamethonium* (20 mg/kg), kurz vor Mintacol i.v. injiziert, war nicht in der Lage, die pressorische Wirkung zu verhindern, schien sie vielmehr sogar zu verstärken, obgleich die verabfolgte Dosis wohl zu einer vollständigen ganglionären Blockade ausreichte (Abb. 3c). Die Erklärung dürfte sein, daß Hexamethonium zwar die sympathischen Ganglien, nicht aber das *Nebennierenmark* vollständig blockiert, so daß die unter der Mintacolwirkung aus den Nebennieren noch sezernierten Adrenalinmengen bei der ganglioplegisch sensibilisierten Peripherie unter Umständen sogar eine verstärkte pressorische Wirkung haben. Verabfolgt man sowohl Atropin als Hexamethonium, so verursacht Mintacol keine Blutdrucksteigerung mehr (Abb. 3d). Atropin scheint die nach Hexamethonium nur unvollständige Blockade des Nebennierenmarks zu einer vollständigen zu machen.

In einer früheren Arbeit (Greeff, Westermann u. Bohné) fanden wir, daß die blutdrucksteigernde, zum Teil durch eine Hormonausschüttung aus dem Nebennierenmark verursachte Wirkung hoher Cholindosen bei Katzen sich durch den

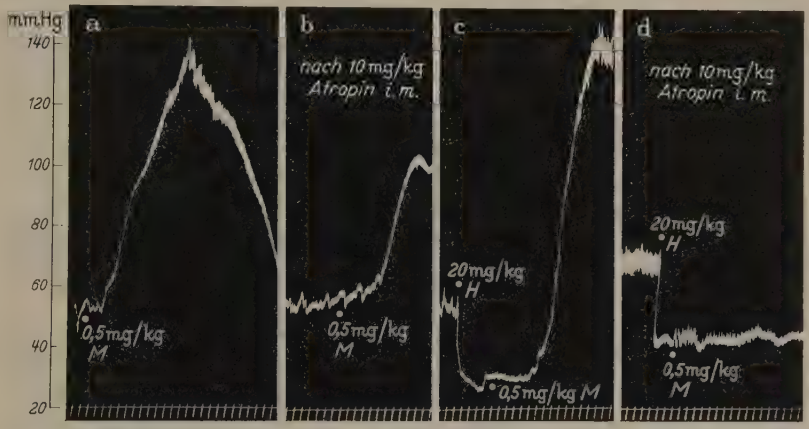


Abb. 3. *Beeinflussung der pressorischen Wirkung des Mintacols durch Atropin und Hexamethonium. Ratten* (160—250 g) in Urethannarkose. Künstliche Beatmung. a 0,5 mg/kg Mintacol (*M*) i.m. — b wie a jedoch 30 min vor Mintacol 10 mg/kg Atropin. sulfuric. i.m. — c wie a jedoch 3 min vor Mintacol 20 mg/kg Hexamethonium (*H*) i.v. — d wie a jedoch 30 min vor Mintacol 10 mg/kg Atropin. sulfuric. i.m. und 2 min vorher 20 mg/kg Hexamethonium (*H*) i.v. — Zeitschreibung: 1 min

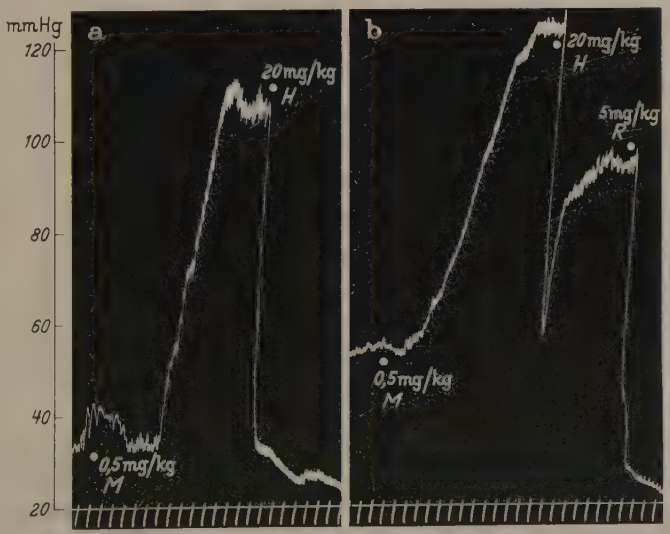


Abb. 4. *Beeinflussung der pressorischen Wirkung des Mintacols durch Hexamethonium an der normalen* (b) *und adrenalektomierten Ratte* (a). Urethannarkose. Künstliche Beatmung. — *Ratte* (a) 190 g, Adrenalektomie 20 min vor Mintacolinjektion. — *Ratte* (b) 250 g, *M* Mintacol i.m., *H* Hexamethonium i.v., *R* Regitin i.v. [2- (N-p-Tolyl-N-m-oxyphenyl-aminomethyl)-imidazolin]

Ganglienblocker Pendiomid (N,N,N′,N′-3-pentamethyl-N,N′-diaethyl-3-azapentylen-1,5-diammoniumdibromid) abschwächen und durch eine zusätzliche Dosis von nur 100 γ/kg Atropin vollständig verhindern ließ.

Die oben gegebene Deutung der Atropinwirkung steht im Einklang damit, daß an der *adrenalektomierten* Ratte Hexamethonium auch ohne Atropin den durch Mintacol verursachten Blutdruckanstieg vollständig aufhebt (Abb. 4a), während es diesen am *Normaltier* nur kurzfristig senkt (Abb. 4b). Der erneute Blutdruckanstieg läßt sich dann durch ein Sympathicolyticum (Regitin) vollständig beseitigen (Abb. 4b).

3. Der Einfluß von Atropin auf die narkoseverkürzende Wirkung der Cholinesterasehemmer

Atropin schwächt bei höherer Dosierung die narkoseverkürzende Wirkung des Mintacols ab, obwohl es selbst narkoseverkürzend wirkt (Tab. 10, Vers. Nr. 1). Die kleine Dosis von 0,5 mg/kg verkürzt zwar

Tabelle 10. *Beeinflussung der Narkosedauer durch Atropin und Cholinesterasehemmer* Gruppen von je 5 weißen Mäusen. — *Kontrolltiere:* 75—100 mg/kg Evipannatrium i.p. — *Versuchstiere: Mintacol* i.m. 12 Std vor Evipan. — *Physostigmin* s.c. 10 min, *Atropin* s.c. 30 min vor Evipan

Vers. Nr.	Gruppe	Dosis mg/kg		Mittlere Narkosedauer		
				Minuten	Differenz %	P-Wert
1	I	100,0	Evipan	78,6	—	—
	II	0,5	+ Mintacol	44,8	II: I = —43	< 0,001
	III	0,5	+ Atropin	64,6	III: I = —18	< 0,02
	IV	0,5 + 0,5	Mintacol + Atropin	49,2	IV: I = —37	< 0,001
					IV: II = +10	< 0,1
					IV: III = —24	< 0,001
	V	5,0	+ Atropin	48,2	V: I = —39	< 0,001
	VI	0,5 + 5,0	Mintacol + Atropin	60,2	VI: I = —23	< 0,01
					VI: II = +35	< 0,001
					VI: V = +26	< 0,1
2	I	75,0	Evipan	42,0	—	—
	II	0,1	+ Physostigmin	23,8	II: I = —43	< 0,01
	III	1,0	+ Atropin	19,6	III: I = —53	< 0,01
	IV	0,1 + 1,0	Physostigmin + Atropin	33,4	IV: I = —21	< 0,1
					IV: II = +40	< 0,05
					IV: III = +70	< 0,05

selbst die Narkosedauer von 78,6 auf 64,6 min, läßt aber die narkoseverkürzende Wirkung des Mintacols unbeeinflußt (Vers. Nr. 1, Gruppe I bis IV). Demgegenüber wird durch die 10fach höhere Atropindosis (5 mg/kg), obwohl sie an sich die Narkose stärker verkürzt als die 10fach kleinere Dosis, die Mintacolwirkung deutlich abgeschwächt, so daß Mintacol die Narkosedauer nicht mehr von 78,6 auf 44,8, sondern nur noch auf 60,2 min verkürzt (Vers. Nr. 1, Gruppe V und VI). — Dasselbe Ergebnis hatten Versuche, in denen Physostigmin anstatt Mintacol als Cholinesterasehemmer verabfolgt wurde (Tab. 10, Vers. Nr. 2).

4. *Die Beeinflussung der narkoseverlängernden Wirkung des Serotonins und Reserpins durch Hemmung der Cholinesterase*

a) In früheren Untersuchungen (Holtz, Balzer, Westermann u. Wezler) hatten wir gefunden, daß die narkoseverlängernde Wirkung des Serotonins bei *intraperitonealer* Injektion nach 50 mg/kg nicht stärker war als nach 20 und 10 mg/kg. Injiziert man *subcutan*, so findet man eine deutliche Abhängigkeit der Wirkung von der Dosis (Tab. 11). Schon 1 mg/kg, das bei intraperitonealer Injektion wirkungs*los* ist, verlängert bei subcutaner Injektion die Evipannarkose um 64%, 5 bzw. 25 mg je Kilogramm s.c. verlängern sie um 195 bzw. 335% (Vers. Nr. 1).

Tabelle 11. *Beeinflussung der narkoseverlängernden Wirkung des Serotonins durch Mintacol bzw. Iproniacid*

Gruppen von je 5 weißen Mäusen. — *Kontrolltiere:* 60—75 mg/kg Evipannatrium i.p. — *Versuchstiere:* Serotonin s.c. 10 min vor Evipan. Mintacol bzw. Iproniacid i.m. 20 Std vor Evipan

Vers. Nr.	Gruppe	Dosis mg/kg		Mittlere Narkosedauer		
				Minuten	Differenz %	P-Wert
1	I	60,0	Evipan	15,0	—	—
	II	1,0	+ Serotonin	24,6	II: I = + 64	< 0,001
	III	5,0	+ Serotonin	44,4	III: I = +195	< 0,001
					III: II = + 81	< 0,01
	IV	25,0	+ Serotonin	65,4	IV: I = +335	< 0,001
					IV: II = +168	< 0,001
					IV: III = + 47	< 0,05
2a	I	75,0	Evipan	23,6	—	—
	II	0,5	+ Mintacol	12,0	II: I = — 49	< 0,001
	III	2,0	+ Serotonin	33,0	III: I = + 40	< 0,001
	IV	0,5	+ Mintacol	20,0	IV: I = — 15	< 0,1
		2,0	Serotonin		IV: II = + 67	< 0,01
					IV: III = — 65	< 0,001
	V	20,0	+ Serotonin	54,0	V: I = +128	< 0,001
	VI	0,5	+ Mintacol	32,4	VI: I = + 37	< 0,01
		20,0	Serotonin		VI: II = +170	< 0,001
					VI: V = — 38	< 0,01
2b	VII	100,0	+ Iproniacid	15,0	VII: I = — 36	< 0,001
	VIII	100,0	+ Iproniacid	21,6	VIII: I = — 8	< 0,6
		2,0	Serotonin		VIII: III = — 35	< 0,01
					VIII: VII = + 44	< 0,1
	IX	100,0	+ Iproniacid	28,6	IX: I = + 21	< 0,05
		20,0	Serotonin		IX: V = — 47	< 0,001
					IX: VII = + 91	< 0,001

Während die nur schwache narkoseverlängernde Wirkung des *Noradrenalins* durch Mintacol und Physostigmin verstärkt wurde (vgl. Tab. 4), wird die narkoseverlängernde Wirkung des *Serotonins* abgeschwächt (Tab. 11, Vers. Nr. 2a). — Der zweite Teil des Versuchs (Nr. 2b) zeigt nun, daß in gleicher Weise wie eine Hemmung der

Cholinesterase (Nr. 2a), so auch die Blockierung der *Monoaminoxydase* durch Iproniacid die narkoseverlängernde Wirkung des Serotonins fast aufhebt.

Hemmt man andererseits durch gleichzeitige Vorbehandlung der Versuchstiere mit Physostigmin oder Mintacol *und* Iproniacid sowohl die

Tabelle 12. *Beeinflussung der Narkosedauer durch Hemmung der Cholinesterase und Monoaminoxydase*

Gruppen von je 5 weißen Mäusen. — *Kontrolltiere:* 60—80 mg/kg Evipannatrium i.p. — *Versuchstiere:* Iproniacid und Mintacol i.m. 20 Std vor Evipan. — Physostigmin s.c. 10 min vor Evipan

Vers. Nr.	Gruppe	Dosis mg/kg		Mittlere Narkosedauer		
				Minuten	Differenz %	P-Wert
1	I	60,0	Evipan	18,4	—	—
	II	0,1	+ Physostigmin	9,0	II: I = — 56	< 0,05
	III	100,0	+ Iproniacid	9,4	III: I = — 49	< 0,05
	IV	0,1 + 100,0	Physostigmin + Iproniacid	29,0	IV: I = + 57	< 0,02
					IV: II = +222	< 0,01
					IV:III = +208	< 0,01
2	I	60,0	Evipan	16,4	—	—
	II	0,1	+ Physostigmin	11,8	II: I = — 28	< 0,05
	III	100,0	+ Iproniacid	11,0	III: I = — 33	< 0,05
	IV	0,1 + 100,0	Physostigmin + Iproniacid	22,6	IV: I = + 38	< 0,3
					IV: II = + 92	< 0,02
					IV:III = +106	< 0,02
3	I	75,0	Evipan	24,8	—	—
	II	0,1 + 100,0	Physostigmin + Iproniacid	30,8	II: I = + 24	< 0,05
4	I	75,0	Evipan	34,0	—	—
	II	0,5	+ Mintacol	22,6	II: I = — 34	< 0,02
	III	100,0	+ Iproniacid	12,4	III: I = — 64	< 0,001
	IV	0,5 + 100,0	Mintacol + Iproniacid	25,2	IV: I = — 26	< 0,05
					IV: II = + 11	< 0,2
					IV:III = +103	< 0,001
5	I	80,0	Evipan	55,0	—	—
	II	0,5	+ Mintacol	41,2	II: I = — 26	< 0,001
	III	100,0	+ Iproniacid	34,8	III: I = — 37	< 0,001
	IV	0,5 + 100,0	Mintacol + Iproniacid	45,0	IV: I = — 18	< 0,2
					IV: II = + 10	< 0,2
					IV:III = + 29	< 0,01

Cholinesterase als auch die Aminoxydase des Gehirns, so addieren sich nicht die zu Narkoseverkürzung führenden Einzelwirkungen, sondern heben sich gegenseitig auf, oder werden sogar in eine narkoseverlängernde Wirkung umgewandelt (Tab. 12).

Eine ähnliche paradoxe Wirkung beobachtet man unter bestimmten Versuchsbedingungen bei der gleichzeitigen Einwirkung von *Reserpin* und *Mintacol*.

b) Die narkose*verlängernde* Wirkung des *Reserpins*, der eine initiale Phase der Narkoseverkürzung voraufgeht (Tab. 13, Vers. Nr. 6, 7, 8), erreicht bei Mäusen ungefähr 5 Std nach der Injektion ihr Maximum, verschwindet im Laufe von 22—24 Std und geht dann in eine narkose*verkürzende* Wirkung über (Abb. 5). Die Phase der narkoseverkürzenden Reserpinwirkung schwankt um die 24-Stundengrenze. Nach 30 Std hat Reserpin keinen signifikanten Einfluß mehr auf die Narkosedauer.

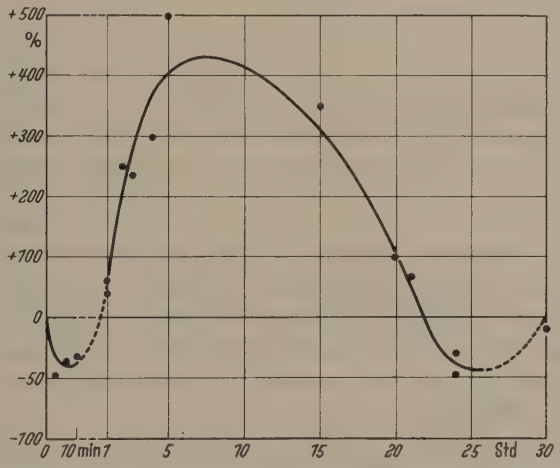


Abb. 5. *Verlängerung und Verkürzung der Narkosedauer durch Reserpin in Abhängigkeit von der Einwirkungszeit.* Gruppen von je 5 weißen Mäusen. — *Kontrolltiere:* 50—75 mg/kg Evipannatrium i.p. — *Versuchstiere:* 4 min bis 30 Std vor Evipan 2 mg/kg Reserpin s.c. — Prozentuale Änderung der Narkosedauer gegenüber den entsprechenden Kontrollgruppen (siehe auch Tab. 13)

Die Beeinflussung der Reserpinwirkung durch Cholinesterasehemmer hängt von dem *Zeitpunkt* ab, zu dem untersucht wird. Im Versuch 1 der Tab. 13 wurde die narkose*verlängernde* Wirkung des 2 Std vor Evipan injizierten Reserpins durch Physostigmin, das in diesem Versuch die Narkosedauer ebenfalls etwas verlängerte, vollständig aufgehoben, und in den Versuchen 2 und 3 durch Mintacol abgeschwächt. Umgekehrt kam es in den Versuchen 4 und 5, in denen Reserpin 24 Std vor Evipan verabfolgt worden war und die Narkose *verkürzte*, durch Mintacol, das an sich ebenfalls eine Verkürzung der Narkosedauer verursachte, zu einer starken *Verlängerung* der Narkose, während im gleichen Versuch (Vers. Nr. 4, Gruppe V—VII) die narkose*verlängernde* Wirkung des nur 4 Std vor Evipan injizierten Reserpins wiederum durch Mintacol abgeschwächt wurde. Nach 30 Std schließlich (Vers. Nr. 5, Gruppe V und VI) beeinflußt Reserpin die Narkosedauer nicht mehr, und Mintacol wirkt wie am Normaltier.

Tabelle 13. *Reserpin und Cholinesterasehemmer*

Gruppen von je 5 weißen Mäusen. — *Kontrolltiere:* 50—75 mg/kg Evipannatrium i.p. — *Versuchstiere:* Physostigmin s.c. 10 min vor Evipan. — Mintacol i.m. 4—24 Std vor Evipan. — Reserpin s.c. (* i.v.) 4 min bis 30 Std vor Evipan

Vers. Nr.	Gruppe	Dosis mg/kg		Mittlere Narkosedauer		
				Minuten	Differenz %	P-Wert
1	I	50,0	Evipan	6,8	—	—
	II	0,2	+ Physostigmin	17,2	II: I = +152	< 0,05
	III	1,0	+ Reserpin (2 Std)	55,6	III: I = +720	< 0,001
	IV	0,2 + 1,0	Physostigmin + Reserpin (2 Std)	18,8	IV: I = +176	< 0,02
					IV: II = + 9	< 0,7
					IV: III = — 66	< 0,01
2	I	75,0	Evipan	44,2	—	—
	II	0,05	+ Mintacol (10 min)	21,2	II: I = — 52	< 0,001
	III	1,0	+ Reserpin (2 Std)	53,8	III: I = + 22	< 0,01
	IV	0,05 + 1,0	Mintacol + Reserpin (2 Std)	36,6	IV: I = — 17	< 0,01
					IV: II = + 73	< 0,01
					IV: III = — 32	< 0,001
3	I	50,0	Evipan	7,6	—	—
	II	0,5	+ Mintacol (20 Std)	0	II: I = —100	
	III	2,0	+ Reserpin (2 Std)	26,4	III: I = +248	< 0,001
	IV	0,5 + 2,0	Mintacol (20 Std) + Reserpin (2 Std)	12,4	IV: I = + 63	< 0,05
					IV: II = — 53	< 0,001
4	I	75,0	Evipan	21,8	—	—
	II	0,5	+ Mintacol (24 Std)	10,5	II: I = — 52	< 0,001
	III	2,0	+ Reserpin (24 Std)	15,8	III: I = — 28	< 0,001
	IV	0,5 + 2,0	Mintacol (24 Std) + Reserpin (24 Std)	42,0	IV: I = + 93	< 0,001
					IV: II = +300	< 0,001
					IV: III = +166	< 0,001
	V	0,5	+ Mintacol (4 Std)	13,2	V: I = — 39	< 0,001
	VI	2,0	+ Reserpin (4 Std)	87,0	VI: I = +300	< 0,001
	VII	0,5 + 2,0	Mintacol (4 Std) + Reserpin (4 Std)	62,0	VII: I = +184	< 0,001
					VII: V = +370	< 0,001
					VII: VI = — 29	< 0,1
5	I	75,0	Evipan	27,0	—	—
	II	0,5	+ Mintacol (7 Std)	13,6	II: I = — 50	< 0,001
	III	2,0	+ Reserpin (24 Std)	12,6	III: I = — 53	< 0,001
	IV	0,5 + 2,0	Mintacol (7 Std) + Reserpin (24 Std)	55,4	IV: I = +105	< 0,001
					IV: II = +307	< 0,001
					IV: III = +340	< 0,001
	V	2,0	+ Reserpin (30 Std)	24,0	V: I = — 11	< 0,6
	VI	0,5 + 2,0	Mintacol (7 Std) + Reserpin (30 Std)	18,6	VI: I = — 31	< 0,05
					VI: II = + 37	< 0,2
					VI: V = — 22	< 0,4
6	I	60,0	Evipan	29,4	—	—
	II	2,0	+ Reserpin* (4 min)	15,2	II: I = — 48	0,001

Tabelle 13 *(Fortsetzung)*

Vers. Nr.	Gruppe	Dosis mg/kg		Mittlere Narkosedauer		
				Minuten	Differenz %	P-Wert
7	I	60,0	Evipan	23,2	—	—
	II	2,0	+ Reserpin (10 min)	14,6	II: I = — 36	0,01
	III	2,0	+ Reserpin (75 min)	35,8	III: I = + 54	0,01
8	I	60,0	Evipan	23,8	—	0,001
	II	2,0	+ Reserpin (7 min)	15,4	II: I = — 35	0,02
	III	2,0	+ Reserpin (75 min)	31,8	III: I = + 34	0,001

5. *Die Beeinflussung der Narkose durch Trijodthyronin*

Für eine Reihe von Pharmaka, die ganz verschiedenen chemischen und pharmakologischen Gruppen angehören, ist nachgewiesen worden, daß sie durch *Entkoppelung der oxydativen Phosphorylierung* in den Energiestoffwechsel eingreifen. *Kausale* Zusammenhänge zwischen pharmakologischer und biochemischer Wirkung sind aber nur dann wahrscheinlich, wenn wenigstens der Konzentrationsbereich für beide Wirkungen von der gleichen Größenordnung ist.

Der *Prototyp* eines die oxydative Phosphorylierung entkoppelnden körpereigenen Wirkstoffes ist das *Schilddrüsenhormon*. Da manchen zentral sedativ oder narkotisch wirkenden Pharmaka, z. B. den Barbituraten und manchen Phenothiazinderivaten, eine „entkoppelnde" Wirkung zugeschrieben wird (Literaturübersicht bei Brody), haben wir untersucht, ob *Trijodthyronin*, bei dem diese in ganz besonderem Maße die Grundlage der Wirkung zu sein scheint, die Narkosedauer beeinflußt.

Tabelle 14. *Beeinflussung der Narkosedauer durch Trijodthyronin und 2,4-Dinitrophenol*

Gruppen von je 5 weißen Mäusen. — *Kontrolltiere:* 75 mg/kg Evipannatrium i.p. — *Versuchstiere:* L-3,5,3′-Trijodthyronin s.c. 3 Tage lang 2 mg/kg täglich; am 4. Tag 75 mg/kg Evipannatrium i.p. — 2,4-Dinitrophenol s.c. 30 min vor Evipan

Vers. Nr.	Gruppe	Dosis mg/kg		Mittlere Narkosedauer		
				Minuten	Differenz %	P-Wert
1	I	75,0	Evipan	38,0	—	—
	II	75,0 6,0	+ Evipan Trijodthyronin	93,6	II:I = +146	< 0,001
2	I	75,0	Evipan	34,2	—	—
	II	75,0 20,0	+ Evipan 2,4-Dinitrophenol	56,6	II:I = + 66	< 0,001

An weißen Mäusen, die 3 Tage lang mit *Trijodthyronin* (2 mg/kg täglich) behandelt worden waren, wurde am 4. Tage der Einfluß dieser Vorbehandlung auf die Narkosedauer untersucht. Die mit Schilddrüsenhormon behandelten Tiere machten einen erregten Eindruck. Aus der

Tab. 14 (S. 457 ist zu ersehen, daß die narkotische Wirkung des Evipans trotzdem bei den Trijodthyronintieren gegenüber den Kontrollen um 146% verlängert war. — In einem anderen Versuch verursachten 20 mg/kg 2,4-Dinitrophenol, 30 min vor Evipan subcutan injiziert, eine Verlängerung der Narkosedauer um 66%.

Diskussion

1. In der schon zitierten früheren Arbeit (Holtz, Balzer, Westermann u. Wezler) hatten wir gefunden, daß die Hemmung der *Monoaminoxydase* des Gehirns durch Iproniacid (Isopropyl-isonicotinsäurehydrazid) eine *Verkürzung* der Evipan- und Avertinnarkose verursacht. Aus den jetzt mitgeteilten Untersuchungen geht hervor, daß die Hemmung der *Cholinesterase* des Gehirns durch Physostigmin oder Mintacol die gleiche Wirkung hat. In beiden Fällen ließ sie sich nur demonstrieren, wenn man zwischen der Injektion des Fermenthemmers und derjenigen des Narkoticums einen bestimmten zeitlichen Abstand wahrte. Injizierte man Iproniacid (100 mg/kg) bzw. 0,2—0,5 mg/kg Physostigmin oder Mintacol *kurz* vor dem Narkoticum, so kam es trotz Hemmung der Fermentaktivitäten zu einer *Verlängerung* der Narkosedauer: im ersten Fall durch Hemmung des Barbituratabbaus (Fouts u. Brodie); deshalb wurde nur die Evipan-, nicht die Avertinnarkose durch kurz vorher injiziertes Iproniacid verlängert. Im zweiten Fall durch die Auslösung einer mit Blutdrucksteigerung einhergehenden „adrenergischen Reaktion", die in der Avertinnarkose stark ausgeprägt war und durch Evipan unterdrückt wurde.

Diese „adrenergische" Reaktion trat bei *Meerschweinchen*, und nach kleinen Mintacoldosen (0,02—0,1 mg/kg) auch bei *Ratten*, nicht auf; deshalb wirkte Mintacol in jeder Dosierung bei Meerschweinchen und in niedriger Dosierung auch bei Ratten nie narkoseverlängernd, sondern stets narkoseverkürzend.

Ließ man die „Primärreaktionen" jedoch abklingen, bevor man das Narkoticum injizierte, so war sowohl bei den „Iproniacidtieren" als bei den „Physostigmin-Mintacoltieren" die Narkosedauer signifikant verkürzt. Daraus folgt, daß eine Blockierung der *Monoaminoxydase* sowohl als eine Hemmung der *Cholinesterase* des Gehirns sich narkose*verkürzend* auswirkt.

a) Die Abb. 6 stellt den zeitlichen Verlauf der Iproniacidwirkung auf die *Monoaminoxydase*aktivität des Gehirns und der Leber sowie auf die Dauer der Evipannarkose dar. Ein Vergleich mit der Abb. 1, die den zeitlichen Verlauf der Cholinesterasehemmung in Gehirnhomogenaten und der Narkosebeeinflussung durch Mintacol zeigt, ergibt, daß die Phase der narkose*verlängernden Iproniacid*wirkung 14—18 Std, die der narkose*verlängernden Mintacol*wirkung nur 5—10 min anhält. Die Blockierung der Evipan abbauenden Fermente der Lebermikrosomen durch Iproniacid

dauert viele Stunden, die durch Mintacol ausgelöste „adrenergische Primärreaktion" berechnet sich nach Minuten. Die sich anschließende, mehrere Tage anhaltende Phase der Narkose*verkürzung* unterscheidet sich darin, daß sie bei den mit *Iproniacid* behandelten Tieren schon beendet ist, und Iproniacid die Narkosedauer nicht mehr beeinflußt, obwohl die Aminoxydaseaktivität des Gehirns noch um 70% gehemmt ist (Abb. 6) —, daß hingegen bei den mit *Mintacol* behandelten Tieren die Narkosedauer trotz nur 50%iger Hemmung der Cholinesteraseaktivität noch stark verkürzt ist (Abb. 1), wobei die in beiden Fällen noch vorhandenen Fermentaktivitäten ausreichen dürften, um jede Anhäufung freier *Amine* (Serotonin, Noradrenalin, Adrenalin) bzw. freien *Acetylcholins* unmöglich zu machen.

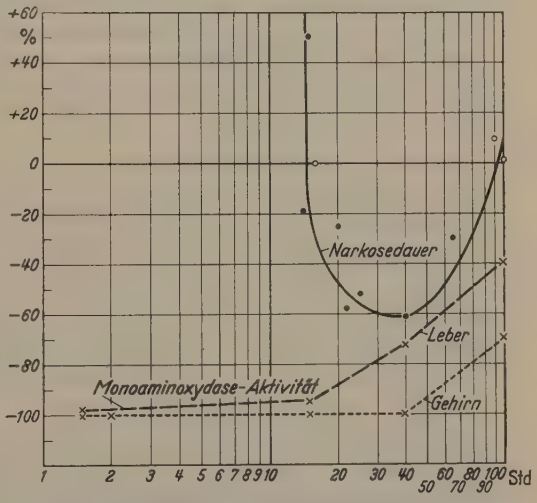


Abb. 6. *Beeinflussung der Narkosedauer sowie der Monoaminoxydase-Aktivität des Gehirns und der Leber durch Iproniacid. (Prozentuale Abweichung von den Kontrollwerten.) Narkosedauer:* Bestimmung an Gruppen von je 5 weißen Mäusen. — *Kontrolltiere:* 75 mg/kg Evipannatrium i.p. — *Versuchstiere:* 1—110 Std vor Evipan je 100 mg/kg Iproniacid i.m. — *Monoaminoxydase-Aktivität:* Kontroll- und Versuchstiere wie oben. Gehirn- und Leberhomogenate von je 3 weißen Mäusen. Bestimmung der Fermentaktivität siehe Methodik. • signifikant, ○ nicht signifikant

Voraussetzung für eine Narkoseverkürzung durch Hemmung der *Aminoxydase* mit Iproniacid ist offensichtlich die *totale* Blockierung des Fermentes, so daß es zu einer *Anhäufung* freier, pharmakologisch aktiver — narkoseverkürzender — biogener Amine kommen kann; demgegenüber ist für die Narkoseverkürzung durch Mintacol eine Anhäufung freien, pharmakologisch aktiven Acetylcholins anscheinend nicht erforderlich, da Mintacol auch dann zu Narkoseverkürzung führt, wenn die *Cholinesterase*aktivität im Gehirnhomogenat noch 50% der Norm beträgt oder — wie in dem Versuch Nr. 3 der Tab. 1 nach 0,02 mg/kg Mintacol — überhaupt nicht nachweisbar vermindert ist, und deshalb eine ubiquitäre Anhäufung freien Acetylcholins nicht möglich wäre.

Die Tatsache, daß die Hemmung zweier *verschiedener* Fermente des Gehirns, der *Aminoxydase* und der *Cholinesterase*, den *gleichen* Effekt — Verkürzung der Narkosedauer — hat, weist ja schon darauf hin, daß der zugrunde liegende Wirkungsmechanismus verschieden sein muß. — Kleinste Dosen von Physostigmin oder

Mintacol können die Erregungsübertragung in der *motorischen Endplatte* des quergestreiften Muskels durch Hemmung der Cholinesterase beeinflussen, ohne daß die Fermenthemmung im *Muskelbrei* nachweisbar wäre. — In unseren Versuchen führten kleinste Mintacoldosen, z. B. 0,02 mg/kg, schon zu einer signifikanten Verkürzung der Narkosedauer, ohne daß im *Gehirnbrei* (Homogenat) eine Hemmung der Cholinesteraseaktivität nachweisbar gewesen wäre.

Während somit das Wesen der narkoseverkürzenden *Mintacol*wirkung vielleicht in einer durch Hemmung der Cholinesterase an cholinergischen cerebralen Synapsen bewirkten *Wirksamkeitssteigerung des synaptischen Überträgerstoffes* und einer dadurch erleichterten Erregungsübertragung besteht, würde die *Iproniacid*wirkung durch die auf dem Wege einer totalen Blockierung der Monoaminoxydase erfolgende *Anhäufung biogener Amine* zustande kommen.

b) Damit würde verständlich, daß nach der Injektion von Mintacol (oder Physostigmin) in kurzer Zeit das *Maximum der Narkoseverkürzung* erreicht ist, da, wie in den motorischen Endplatten des Muskels und in den peripheren Ganglien, so auch in den cholinergischen Synapsen des Gehirns in kurzer Zeit das *Maximum der Fermenthemmung* erreicht ist, die mit fortschreitender Zeit nicht zu-, sondern abnimmt; daß hingegen nach der Injektion von Iproniacid, obwohl auch jetzt in kurzer Zeit die *Fermenthemmung* maximal ist (siehe Abb. 6), die *Verkürzung der Narkosedauer* mit fortschreitender Zeit zunimmt.

Die nach Iproniacid mit fortschreitender Zeit zunehmende Verkürzung der *Evipan*narkose (vgl. Abb. 6) könnte dadurch vorgetäuscht sein, daß die narkoseverlängernde Hemmung des Barbituratabbaus durch Iproniacid interferiert. Aber auch die *Avertin*narkose, bei der das nicht in Frage kommt, erfährt mit zunehmendem zeitlichen Abstand von der Iproniacidinjektion eine zunehmende Verkürzung, wie wir schon früher zeigen konnten: so war z.B. die Avertinnarkose *1 Std* nach Iproniacid um 20%, *18 Std* nach Iproniacid um 58% verkürzt (Holtz, Balzer, Westermann u. Wezler). Wir haben das damit erklärt, daß es bei total blockierter Monoaminoxydase im Gehirn, d. h. bei blockiertem *Abbau*, durch die ungestörte kontinuierliche physiologische Amin*bildung* zu einer mit der Zeit zunehmenden Anhäufung freier, pharmakologisch wirksamer — narkoseverkürzender — biogener Amine kommen müsse.

Verständlich wird dann auch, daß wir nach den von uns angewandten kleinen narkoseverkürzenden *Physostigmin-* und *Mintacol*dosen (0,02 bis 0,1 mg/kg) nicht einen gegenüber der Norm erhöhten *Acetylcholingehalt*, wohl aber nach *Iproniacid* einen erhöhten *Serotoningehalt* in den Gehirnen der Versuchstiere fanden (Holtz, Balzer u. Westermann).

Eine totale Blockade der *Monoaminoxydase* ist mit dem Leben vereinbar, eine totale Blockade der *Cholinesterase* nicht. So erklärt sich, daß z. B. Herken u. Neubert nach krampfauslösenden bzw. *tödlichen* Dosen von Cholinesterasehemmern bei Mäusen den Acetylcholingehalt der Gehirne *erhöht* fanden.

2. *Elektrophysiologische* Untersuchungen haben ergeben, daß die elektrische Reizung des ascendierenden reticulären Systems eine corticale *Desynchronisierung*,

d. h. Abnahme der Amplitude und Zunahme der Frequenz im EEG — „arousal reaction", Weckreaktion — hervorruft, die Stimulierung des intralaminären thalamo-corticalen Systems eine corticale *Synchronisierung* — „recruiting reaction", Schlaf. (Moruzzi u. Magoun; Hess). Zu den Pharmaka, die den Effekt einer peripheren oder reticulären Reizung — eine „arousal reaction" — *verhindern*, gehören die *Narkotica* in narkotisch wirksamer Dosierung. Zu den Pharmaka, die eine elektrophysiologisch nachweisbare „arousal reaction" *auslösen*, gehören u. a. die lipoidlöslichen und leicht ins Gehirn eindringenden Cholinesterasehemmer, wie z.B. *Physostigmin* und die Alkylphosphate DFP, TFPP, E 605 und E 600 (Mintacol) (siehe z. B. Freedman u. a., Rinaldi u. Himwich; Literatur bei Bovet u. Longo sowie bei v. Brücke). Das hat zu der Annahme *cholinergischer* Wirkungs- und Überträgermechanismen im ascendierenden reticulären System geführt (Rinaldi u. Himwich; Longo). Aber auch *Adrenalin*, *Amphetamin* und *Serotonin* können eine „arousal reaction" auslösen (Bonvallet, Dell u. Hiebel; Bradley; Gangloff u. Monnier).

Es ist deshalb verständlich, daß die von uns untersuchten, leicht in das Zentralnervensystem eindringenden Esteraseblocker *Physostigmin* und *Mintacol* durch die Aktivierung des cholinergischen ascendierenden reticulären Systems eine hier durch *Narkotica* verursachte Dämpfung antagonistisch beeinflussen und deshalb narkoseverkürzend wirken —, und daß *Atropin* diese Wirkung abschwächt. Nicht ohne weiteres verständlich ist, weshalb der Narkose*verkürzung* eine Phase der Narkose*verlängerung* vorausgeht.

Greig u. Mayberry konnten zeigen, daß Cholinesterasehemmer die Durchlässigkeit der *Blut-Liquorschranke* für Farbstoffe und Veronal erhöhen, so daß es nach der i.v. Injektion des Narkoticums zu einer Beschleunigung des Narkoseeintritts kam. Das kann aber kaum die Ursache für die von uns beobachtete Verlängerung der Evipan- und Avertinnarkose sein, die durch eine kurz vorher erfolgte Injektion von Physostigmin oder Mintacol hervorgerufen wird; denn auch die bei voll ausgebildeter *Avertin*narkose *nachträglich* erfolgende Injektion von Mintacol verlängert die Narkosedauer (vgl. Tab. 7).

Einen Hinweis auf die Ursache gibt die Beobachtung, daß Mintacol zwar noch in voll ausgebildeter *Avertin*narkose, nicht aber *in* der *Evipan*narkose narkoseverlängernd wirkt (vgl. Tab. 5). *Evipan*, nicht aber *Avertin* (oder Urethan), verhindert die nach größeren Mintacoldosen (z. B. 0,5 mg/kg) auftretende „blutdrucksteigernde, adrenergische Reaktion", die durch eine zentrale Stimulierung des Sympathicus und eine Adrenalinausschüttung aus den Nebennieren verursacht ist (vgl. Abb. 2).

Aus elektrophysiologischen Untersuchungen von Bonvallet, Dell u. Hiebel (Elektrocorticogramm, ECG) an unbetäubten Katzen und Hunden läßt sich schließen, daß für die Aufrechterhaltung des Wachzustandes nicht nur der kontinuierliche Einstrom propioceptiver und exteroceptiver Reize zum Gehirn, sondern auch der „*periphere Sympathicustonus*" von Bedeutung ist. Es ließ sich zeigen, daß die durch Applikation nociceptiver Reize, z. B. die elektrische Stimulierung des zentralen Ischiadicusstumpfes ausgelöste, im ECG zum Ausdruck kommende Aktivitätssteigerung des Cortex einmal auf einer direkten *nervalen* Stimulierung des ascendierenden reticulären Systems — über Kollateralen der aufsteigenden Schleifenbahnen — beruht, die in Durchschneidungsversuchen durch eine *rostral* zur pons

gelegene Schnittführung unterdrückt wurde; sodann auf einer auch jetzt noch möglichen, nachfolgenden „*humoralen*" Stimulierung durch eine Adrenalinausschüttung aus dem Nebennierenmark. Der Angriffspunkt der Adrenalinwirkung liegt aber nicht in corticalen, sondern in ponto-mesencephalen Formationen, deren ascendierendes reticuläres System für die Regulation und Kontrolle der corticalen Aktivität von Bedeutung ist. Durch Stimulierung dieses Systems ruft *Adrenalin* eine zu corticaler Aktivitätssteigerung führende „arousal reaction" hervor. Diese wird in Durchschneidungsversuchen bei etwas mehr caudalwärts gelegener Schnittführung unterdrückt —, und durch *Narkotica*, schon in kleinen Dosen (Chloralose, Barbiturate). Daneben kann Adrenalin aber eine sich gerade entgegengesetzt auswirkende, zu progressiver Reduzierung der corticalen Aktivität führende, rein nerval vermittelte Reaktion auslösen: von den Baroreceptoren des *Carotissinus*. Dehnung des Carotissinus verursacht Muskelerschlaffung und Schlafneigung, wie E. Koch schon vor 25 Jahren an unbetäubten Hunden beobachtete.

Für die Deutung unserer Versuchsergebnisse mit *Adrenalin* und *Noradrenalin* ist nun wesentlich, daß Noradrenalin im Gegensatz zu Adrenalin das ascendierende reticuläre System *nicht* stimuliert und keine „arousal reaction" hervorruft (DeMaar and Martin), so daß ihm nur die über die Carotissinusreceptoren nerval vermittelte dämpfende Wirkung auf die corticale Aktivität zukommt, und Noradrenalin deshalb stets narkoseverlängernd wirkt, niemals narkoseverkürzend wie Adrenalin am Normaltier. Am „*Mintacoltier*", bei dem einerseits durch Sensibilisierung des cholinergischen ascendierenden Systems eine erhöhte corticale Aktivität besteht, und andererseits die Carotissinusreflexe gesteigert sind (Vercauteren; Hornkiewicz u. Kobinger), vermag Adrenalin offensichtlich weniger das schon cholinergisch aktivierte reticuläre System noch weiter zu aktivieren und dadurch die Narkosedauer noch weiter zu *verkürzen*, als vielmehr — wie Noradrenalin — nur über den Carotissinus eine Dämpfung der corticalen Aktivität zu verursachen. Es resultiert eine *Verlängerung* der Narkosedauer. — *Pervitin* in der von uns angewandten Dosierung ist hierzu nicht in der Lage. Seine in der Formatio reticularis etwas mehr caudalwärts lokalisierte, zu einer „arousal reaction" führende — narkoseverkürzende — Wirkung wurde durch Mintacol noch verstärkt (siehe Tab. 5).

Ob die narkoseverlängernde Wirkung des Adrenalins am „Mintacoltier" und des Noradrenalins auch am Normaltier *ausschließlich* über den Carotissinus zustande kommt, ist fraglich, da auch die *intracisternale* Injektion narkotisch wirkt (siehe z. B. Leimdörfer), und Adrenalin, wenn auch schwächer als Serotonin, die Erregungsübertragung an corticalen Synapsen hemmen soll (Gluckman, Hart u. Marazzi).

3. Ein besonders bemerkenswerter Befund unserer Untersuchungen ist, daß *Reserpin*, wenige Minuten vor Evipan injiziert, die Narkose verkürzt, und auch nach längerer Einwirkung (etwa 24 Std) seine bekannte narkose*verlängernde* Wirkung nicht einfach einbüßt, sondern innerhalb eines kurz bemessenen Zeitraumes wiederum narkose*verkürzend* wirkt, obwohl die Tiere noch einen sedativen Eindruck machen (siehe Tab. 10).

Hemmung der Cholinesterase durch Mintacol schwächt die narkose*verlängernde* Wirkung des Reserpins ab und wandelt die narkose*verkürzende* Reserpinwirkung in eine narkose*verlängernde* um, obwohl Mintacol *allein* die Narkosedauer verkürzt. Es kommt also zu einer geradezu *paradoxen* Reaktion, indem die kombinierte Einwirkung zweier Stoffe — Reserpin, Mintacol —, von denen jeder für sich narkose*verkürzend* wirkt, zu einer signifikanten Narkoseverlängerung führt. Das fand eine Parallele darin, daß die gleichzeitige Hemmung bzw. Blockierung der Cholinesterase und Monoaminoxydase des Gehirns durch Vorbehandlung der Tiere mit Mintacol *und* Iproniacid nicht zu einer Addition, sondern zu einer Abschwächung der narkoseverkürzenden Einzelwirkungen führte (vgl. Tab. 12).

Wenn man sich nicht damit begnügen will, diese paradoxe Reaktion nur als Tatsache zu registrieren, sondern wenigstens den *Versuch* unternimmt, sie zu erklären, so hätte dieser unseres Erachtens von folgenden Überlegungen auszugehen und könnte zu folgendem Ergebnis führen:

Der eine Zeitpunkt der Reserpinwirkung, in dem die Narkosedauer verkürzt ist (nach etwa 24 Std), ist dadurch gekennzeichnet, daß, bei aufgehobener Bindungsfähigkeit des Gewebes für biogene Amine und weitgehender Verarmung des Gehirns an diesen, die Amin*bildung* ungestört weitergeht — durch Decarboxylierung der entsprechenden Aminosäuren —, aber nur an den Stellen im Gehirn erfolgen kann, an denen sich die decarboxylierenden Fermente befinden. Diese befinden sich *nicht* im Cortex, wohl aber im Stammhirn: „Spezifische Topographie der Fermentaktivität" (Holtz u. Westermann). Der andere Zeitpunkt, zu dem Reserpin die Narkosedauer verkürzt (nach 5—10 min), ist dadurch charakterisiert, daß Serotonin — durch die Aufhebung der Bindungsfähigkeit des Gewebes für biogene Amine — da in größter Konzentration frei wird und zur Wirkung gelangt, wo es in größter Konzentration vorkommt, nämlich wiederum im Stammhirn: „Spezifische Topographie des Amingehaltes".

Wenn man, wie wir das früher getan haben, die narkose*verlängernde* Reserpinwirkung mit einer corticalen *Dämpfung* durch das im Cortex freigesetzte Serotonin erklärt, das zu einer Erhöhung der Reizschwelle führt, — wofür elektrophysiologische Untersuchungen von Gangloff u. Monnier Anhaltspunkte gaben —, bzw. mit einer Hemmung der Erregungsübertragung an corticalen Synapsen (Marazzi; Gluckman, Hart u. Marazzi), so müßte die Stimulierung der cholinergischen Formatio reticularis durch Cholinesterasehemmer die narkoseverlängernde Reserpinwirkung abschwächen oder aufheben, wie sie das auch tut. Wenn man die narkose*verkürzende* Reserpinwirkung auf eine *Stimulierung* des ascendierenden reticulären Systems durch das hier — bei aufgehobener Bindungsfähigkeit für Amine — enzymatisch entstehende Serotonin zurückführt, so könnte die Umwandlung der narkose*verkürzenden* in eine narkose*verlängernde* Wirkung am „Mintacoltier" ihre Ursache darin haben, daß der durch Serotonin erhöhte Aktivitätszustand der Formatio reticularis, der eine Hemmung der tiefer

gelegenen bulbären Zentren bedeutet („bulbär-inhibitorisches System"), durch Sensibilisierung dieser Zentren mit Mintacol rückläufig herabgesetzt wird. — Eine andere Möglichkeit, die nach Mintacol erfolgende Umkehr der Narkose*verkürzung* in eine *Verlängerung* zu erklären, wäre: sie als „Wedensky"-Hemmung der neuronenreichen, cholinergisch-polysynaptischen Formatio reticularis zu deuten, die sich durch das — bei aufgehobener Bindungsfähigkeit für biogene Amine — enzymatisch dauernd in ihr entstehende, der Gruppe der „Intermediärstoffe" (Fleckenstein) als zum Teil „indirekt" wirkendes Amin (Balzer u. Holtz) angehörende Serotonin schon in einem erhöhten Aktivitätszustand befindet und eine weitere cholinergische Aktivierung durch Mintacol mit einer funktionellen Hemmung (Wedensky) beantwortet. Das fände eine Parallele in der ebenfalls als Wedensky-Hemmung gedeuteten zentralen Depression der *Atmung* durch Hemmung der Cholinesterase (Schaumann), die wesentlich an der *tödlichen* Wirkung der ins Zentralnervensystem eindringenden Cholinesterasehemmer beteiligt ist.

4. Wie eine im EEG als *Desynchronisierung* sich manifestierende „corticale Aktivierung" ihre Ursache nicht *nur* in einer durch Stimulierung des ascendierenden reticulären Systems ausgelösten „arousal reaction" zu haben braucht, da Stoffe, die eine corticale Desynchronisierung bewirken, ihren Angriffspunkt in ganz verschiedenen Anteilen des Zentralnervensystems haben können, so bedeutet andererseits nicht jede Desynchronisierung Narkose*verkürzung* und nicht jede Synchronisierung Narkose*verlängerung*.

Während z. B. nach Bradley, Elkes sowie nach Desmedt u. La Grutta Cholinesterasehemmer (Physostigmin, DFP) auch nach Mittelhirndurchschneidung — am „cerveau isolé" („cerveau sans reticulée") — noch zu corticaler Desynchronisierung führen, wird ihnen von Rinaldi u. Himwich ein direkter Angriffspunkt am ascendierenden reticulären System zugeschrieben. In einer soeben erschienenen Arbeit kommen Longo u. Silvestrini in Übereinstimmung mit früheren Befunden von Hiebel zu dem Ergebnis, daß Amphetamin auch am „cerveau isolé" corticale Aktivierung verursacht, während in Versuchen von Elkes u. Mitarb. und von Brücke u. Mitarb. diese durch Mittelhirndurchschneidung sich verhindern ließ. Die durch Scopolamin verursachte Synchronisierung des EEG ließ sich durch cholinerge Substanzen, nicht aber durch Amphetamin durchbrechen (Longo). *Atropin* wirkt trotz corticaler Synchronisierung bei höherer Dosierung „zentralerregend" und verkürzt, wie unsere Untersuchungen gezeigt haben (vgl. Tab. 10), die Narkosedauer.

Wenn Änderungen der Narkosedauer als Kriterium cerebraler pharmakologischer Wirkungen und ihres Angriffspunktes auch nur einen groben Test darstellen, so sind die Resultate vielleicht trotzdem geeignet, den Ergebnissen *elektrophysiologischer* Untersuchungen, die sich als Kriteriums der Wirkung einer im EEG registrierbaren „Synchronisierung" oder „Desynchronisierung" bedienen, eine Ergänzung zu geben, da

ihnen nicht nur die Ableitung vom Aktionspotentialen zugrunde liegt, sondern die Beobachtung und Registrierung einer quantitativ erfaßbaren, *meßbaren biologischen Reaktion.*

Summary

1. In mice the action of anticholinesterases—Eserine and E 600 (Paraoxon; p-nitrophenyl-diaethylphosphate)—on the duration of hexobarbital or avertin anaesthesia depends on the dosage and the time-interval between the injection of the anticholinesterase and the application of the anaesthetic: with *small* doses (0,02—0,1 mg/kg) the anaesthesia is shortened; with *high* doses (0,2—0,5 mg/kg), administered 5—10 min. before the anaesthetic, anaesthesia is prolonged, administered 30 min. — 40 hours before the anaesthetic, anaesthesia is shortened. — The shortening effect of the anticholinesterases on anaesthesia is diminished by *atropine. Prolongation* of anaesthesia is assumed to be caused by the central adrenergic pressor response elicited by the anticholinesterases; *shortening* of anaesthesia by inhibition of the brain-cholinesterase and activation of the cholinergic ascending reticular system of the brain stem ("arousal reaction").

2. Duration of anaesthesia is shortened by *adrenaline* and *methylamphetamine*, it is prolonged by *nor-adrenaline.* This is in accordance with the observation that only adrenaline and methylamphetamine produce an arousal reaction in the EEG. Premedication with anticholinesterases will enhance the action of methylamphetamine whereas the shortening action of adrenaline will be reversed to one of prolongation.

3. The action of *reserpine* on the duration of anaesthesia depends on the time-intervall between the application of the alkaloid and the injection of the anaesthetic. About 5 hours after the injection of reserpine there is a maximal *prolongation* of anaesthesia. 4—10 minutes and about 24 hours after the injection anaesthesia is *shortened.* Inhibition of brain-cholinesterase will diminish or abolish resp. the prolongation and reverse the shortening effect into one of prolongation.

The *mechanism* underlying these different actions is discussed on the assumption that after the injection of reserpine the *binding power* of brain tissue for biogenic amines is abolished whereas *biosynthesis* by decarboxylation of the corresponding aminoacids proceeds. Because of the *specific topographic localization of enzymatic activity* a selective accumulation in the brain stem of free pharmacologicaly active amines will result.

Literatur

Ammon, R.: Die Methoden der Fermentforschung. Bamann u. Myrbäck (1940) 1585.

Balzer, H., u. P. Holtz: Naunyn-Schmiedeberg's Arch. exp. Path. Pharmak. **227**, 547 (1956).

Bonvallet, M., D. Dell et G. Hiebel: Electroenceph. clin. Neurophysiol. **6**, 119 (1956).

Bovet, D., et V. G. Longo: XX. Int. Physiol. Congr. Brüssel 1956. Reviews S. 306.

Bradley, P. B.: Electroencephalogr., Congrès 1953, p. 21.

Bradley, P. B., and J. Elkes: J. Physiol. (Lond.) **120**, 13 P (1953).

Brody, Th. M.: Pharmacol Rev. **7**, 335 (1955).

Brücke, F. v., H. Petsche, S. Sailer u. Ch. Stumpf: Naunyn-Schmiedeberg's Arch. exp. Path. Pharmak. **230**, 335 (1957).

Brücke, F. v.: XX. Int. Physiol. Congr. Brüssel 1956. Reviews S. 465.

De Maar, E. W. J., and W. R. Martin: Fed. Proc. **15**, 416 (1956).

Desmedt, J. E., and G. Grutta: Boll. Soc. ital. Biol. sper. **31**, 913 (1955a).

Dirnhuber, D., and H. Cullumbine: Brit. J. Pharmacol. **10**, 12 (1955).

Elkes, J., C. Elkes and P. B. Bradley: J. ment. Sci. **100**, 125 (1954).

Erdmann, W.-D., u. L. Lendle: Naunyn-Schmiedeberg's Arch. exp. Path. Pharmak. **230**, 208 (1957).

Fleckenstein, A., u. D. Stöckle: Naunyn-Schmiedeberg's Arch. exp. Path. Pharmak. **224**, 401 (1955).

Fouts, J. R., and B. B. Brodie: J. Pharmacol. exp. Ther. **116**, 480 (1956).

Freedman, A. M., P. D. Bales, A. Willis and H. E. Himwich: Amer. J. Physiol. **156**, 117 (1949).

Frommel, E., A. Bischler, P. Gold, P. Favre et F. Vallette: Helv. physiol. pharmacol. Acta **5**, 64 (1947).

Gangloff, H., u. M. Monnier: Helv. physiol. pharmacol. Acta **15**, 83 (1957).

Gluckman, M. J., E. R. Hart and A. S. Marazzi: Science **126**, 448 (1957).

Greeff, K., E. Westermann u. G. Bohné: Naunyn-Schmiedeberg's Arch. exp. Path. Pharmak. **228**, 481 (1956).

Greig, M. E., and R. C. Mayberry: J. Pharmacol. exp. Ther. **102**, 1 (1951).

Herken, H., u. D. Neubert: Naunyn-Schmiedeberg's Arch. exp. Path. Pharmak. **219**, 223 (1953).

Hess, W. R.: Beiträge zur Physiologie des Hirnstammes. Leipzig: Georg Thieme 1938.

Hiebel, G., G. Bonvallet, P. Huvé et P. Dell: Sem. Hôp. Paris **30**, 1880 (1954).

Holtz, P., H. Balzer, E. Westermann u. E. Wezler: Naunyn-Schmiedeberg's Arch. exp. Path. Pharmak. **231**, 333 (1957).

Holtz, P., u. E. Westermann: Naunyn-Schmiedeberg's Arch. exp. Path. Pharmak. **227**, 538 (1956).

Holtz, P., H. Balzer u. E. Westermann: Naunyn-Schmiedeberg's Arch. exp. Path. Pharmak. **231**, 361 (1957).

Hornykiewicz, O., u. W. Kobinger: Naunyn-Schmiedeberg's Arch. exp. Path. Pharmak. **228**, 493 (1956).

Koch, E.: Die reflektorische Selbststeuerung des Kreislaufs. Dresden: Steinkopff 1931.

Lamson, P. D., M. E. Greig and L. Williams: J. Pharmacol. exp. Ther. **106**, 219 (1952).

Leimdörfer, A.: J. Pharmacol. (Kyoto) **98**, 62 (1950).

Longo, V. G.: J. Pharmacol. exp. Ther. **116**, 198 (1956).

Longo, V. G., and B. Silvestrini: J. Pharmacol. exp. Ther. **120**, 160 (1957).

Marazzi, A. S.: Ann. N. Y. Acad. Sci. **66**, 498 (1957).

Moruzzi, G., and H. W. Magoun: Electroenceph. clin. Neurophysiol. I. 455 (1949).

Rinaldi, F., and H. E. Himwich: Arch. Neurol. Psychiatr. (Chicago) **73**, 384 (1955). — Science **122**, 198 (1955).

Schaumann, W.: Naunyn-Schmiedeberg's Arch. exp. Path. Pharmak. **233**, 98 (1958).

Stewart, G. N., and J. M. Rogoff: J. Pharmacol. exp. Ther. **17**, 227 (1921).

Varagic, V.: Brit. J. Pharmacol. **10**, 349 (1955).

Vercauteren, Et.: Arch. internat. Pharmacodynamie **42**, 339 (1932).

Wirth, W.: Naunyn-Schmiedeberg's Arch. exp. Path. Pharmak. **207**, 547 (1949).

Prof. Dr. P. Holtz, Pharmakologisches Institut der Universität Frankfurt a. M., Ludwig-Rehn-Str. 14.

Arch. exper. Path. u. Pharmakol., Bd. 233, S. 468—483 (1958)

Aus dem Pharmakologischen Institut der Universität Frankfurt a. M.
(Direktor: Prof. Dr. P. Holtz)

Vergleich der kaliuretischen Wirkung verschiedener Glykoside des Strophanthidins und Digitoxigenins bei parenteraler und enteraler Applikation

Von
K. Greeff

Mit 4 Textabbildungen

(Eingegangen am 5. November 1957)

Ratten reagieren auf Strophanthin sehr empfindlich mit einer Zunahme der renalen Kaliumausscheidung. Die Dosis, welche notwendig war, um die Kaliumausscheidung um 100% zu erhöhen, betrug 24γ/100 g k-Strophanthin subcutan, d. h. 1,4% der durch i.v. Infusion ermittelten tödlichen Dosis (Greeff 1956). Die kaliuretische Wirkung des Strophanthins tritt in gleicher Weise auch bei nebennierenlosen Ratten auf (Greeff 1957), so daß eine Beteiligung von Nebennierenrindenhormonen an dieser Wirkung unwahrscheinlich ist.

In der vorliegenden Arbeit haben wir untersucht, ob Digitalisglykoside die renale Elektrolytausscheidung in ähnlicher Weise beeinflussen wie Strophanthin, und ob die Glykoside auch bei oraler Applikation wirksam sind.

Methodik

Die Versuche wurden an Gruppen von je 4 Ratten (140—200 g) durchgeführt. Meistens benutzten wir 20 Tiergruppen für einen Versuchsansatz. 2 Tage lang vorher erhielten die Tiere eine Standardkost aus Kartoffelbrei und Körnerfutter mit einem Zusatz von 5,8 g/kg Kochsalz. Der Natriumgehalt dieser Kost betrug etwa 250 mg-%, der Kaliumgehalt 500 mg-%. Am Abend vor dem Versuch wurde das Futter entzogen, nicht das Wasser. Während der Versuchsdauer (6—12 Std) erhielten die Tiere alle 2 Std 2 cm³/100 g Aqua dest. mit der Schlundsonde. Die in 2 Std-Portionen aufgefangenen Harnmengen wurden einzeln untersucht. Die erste Harnportion diente in jedem Versuch und bei allen Tiergruppen als Kontrolle. 2 Std nach Versuchsbeginn erhielten die Ratten das Glykosid subcutan oder i.v. in 0,1—0,2 cm³ bzw. peroral zusammen mit der Wässerung in 2 cm³/100 g Aqua dest.

Die gut wasserlöslichen Strophanthinglykoside wurden in Aqua dest. gegeben, *k-Strophanthin* α (Cymarin) in 2,5% igem Äthanol, Thevetin und Neriifolin in 5—10% igem Äthanol. *Digitoxin* und die Genine *Strophanthidin* und *Digitoxigenin* wurden subcutan in 40% igem, oral in 5—10% igem Äthanol verabreicht. Die Glykosidlösungen wurden zu jedem Versuch frisch hergestellt. Die Kontrolltiere erhielten jeweils die gleiche Menge Aqua dest. bzw. Äthanol in derselben Applikationsform. Der Alkohol ist, wie wir fanden, in den angewandten Mengen ohne

wesentlichen Einfluß auf die renale Elektrolytausscheidung (siehe z. B. Tab. 1 u. Abb. 1). In mehreren Versuchen erhielten Tiergruppen die gut wasserlöslichen Strophanthinglykoside vergleichsweise sowohl in Aqua dest. als in Äthanol; auch dabei traten keine nennenswerten Unterschiede in den Versuchsergebnissen auf.

Die Kalium-, Natrium- und Calciumbestimmungen erfolgten flammenphotometrisch, die Chlorbestimmungen titrimetrisch nach Kuschinsky u. Langecker. Die Ergebnisse stützen sich auf Versuche an über 400 Gruppen von je 4 Ratten. Die Tiere wurden frühestens nach einer 10tägigen Pause erneut zum Versuch verwandt. Für die Überlassung der Glykoside in Substanz danken wir den Firmen C. F. Boehringer-Mannheim, C. H. Boehringer-Ingelheim, Gödecke & Co.-Berlin, Kali-Chemie AG.-Hannover, Merck-Darmstadt und Sandoz A.G.-Nürnberg.

Versuche

1. Intravenöse und subcutane Applikation

a) Digitoxin und k-Strophanthin. In dem Versuch der Tab. 1 haben wir die Wirkung des Digitoxins mit derjenigen des k-Strophanthins verglichen. Je 2 Gruppen (8 Ratten) erhielten *i.v.* 50 γ, 100 γ und 200 γ pro 100 g *Digitoxin*, gelöst in 0,1 cm³ 40%igem Äthanol, 2 Kontrollgruppen die entsprechende Menge Alkohol. Weitere Gruppen erhielten 50 γ *k-Strophanthin* bzw. Aqua dest. Die renale Elektrolytausscheidung, die bei allen Tiergruppen während der 2stündigen Vorperiode annähernd gleich war, wurde durch Digitoxin ähnlich wie durch k-Strophanthin beeinflußt: die *Kaliumausscheidung* nahm in Abhängigkeit von der Dosierung zu. Der Vergleich der beiden Glykoside ergibt, daß 200 γ Digitoxin notwendig sind, um während der ersten 2 Std (1. Harnportion) eine etwa gleichstarke Kaliurie zu erzielen wie mit 50 γ k-Strophanthin. Die Wirkung des Digitoxins hält jedoch länger an. Während die Kaliumausscheidung bei den Strophanthin-behandelten Tieren in der 2. und 3. Harnportion wieder annähernd normal ist, ist die der Digitoxin-behandelten Tiere noch deutlich erhöht. Berücksichtigt man die Gesamtausscheidung während der 6stündigen Versuchsdauer, so sind 100 γ Digitoxin etwas wirksamer als 50 γ k-Strophanthin.

Die Natriumausscheidung wird durch die i.v. Injektion von Strophanthin und Digitoxin weniger beeinflußt als die Kaliumausscheidung: Während der ersten 2 Std nimmt sie in Übereinstimmung mit früheren Ergebnissen (Bode u. Greeff) bei Anwendung höherer Glykosiddosen, die eine starke Kaliurie verursachen, zwar auch zu, kann dann aber während der folgenden Stunden so stark unter die Norm absinken, daß in der 6 Std-Ausscheidung kein wesentlicher Unterschied mehr gegenüber den Kontrolltieren besteht. Von der Höhe der Mehrausscheidung während der ersten *2 Std* hängt es deshalb ab, ob die in einem *6 Std-Versuch* insgesamt ausgeschiedenen Mengen sich von den Kontrollwerten wesentlich unterscheiden. Die *Calcium- und Chlorausscheidung* — in der Tabelle nicht mit angegeben — erfuhr durch beide Glykoside ebenfalls eine Zunahme, jedoch in geringerem Maße als die Kaliumausscheidung.

Tabelle 1. *Die Wirkung von Digitoxin und k-Strophanthin (i.v. und s.c.) auf die renale Wasser- und Elektrolytausscheidung* (siehe Text). Mittelwerte zweier Gruppen von je 4 Ratten pro Kilogramm Tiergewicht. *H.V.* Harnvolumen

Vorperiode			Versuchsperiode											
2 Std			Dosis pro 100 g i.v.	1. Portion 2 Std			2. Portion 2 Std			3. Portion 2 Std			Gesamtausscheidung 6 Std		
H.V. cm³	K m Aeq	Na m Aeq		H.V. cm³	K m Aeq	Na m Aeq	H.V. cm³	K m Aeq	Na m Aeq	H.V. cm³	K m Aeq	Na m Aeq	H.V. cm³	K m Aeq	Na m Aeq
19,2	0,47	0,20	0,1 cm³ Äthanol	20,5	0,24	0,41	18,2	0,18	0,35	18,1	0,21	0,29	56,8	0,63	1,05
20,5	0,52	0,24	50 γ Digitoxin	20,7	0,61	0,38	19,6	0,48	0,21	17,2	0,38	0,11	57,5	1,47	0,70
21,2	0,41	0,18	100 g Digitoxin	21,3	1,76	0,83	20,5	1,38	0,16	16,5	0,74	0,08	58,3	3,88	1,07
20,2	0,44	0,21	200 γ Digitoxin	22,4	2,63	1,13	20,2	1,74	0,16	15,3	0,61	0,13	57,9	4,98	1,42
19,8	0,54	0,20	0,1 cm³ Aqua dest.	20,1	0,22	0,21	18,8	0,21	0,24	17,2	0,24	0,38	56,1	0,67	0,83
20,1	0,49	0,25	50 γ k-Strophanthin	29,0	2,79	0,80	18,9	0,34	0,05	13,3	0,26	0,04	61,2	3,39	0,89
			subcutan												
20,1	0,54	0,23	0,1 cm³ Äthanol	19,9	0,31	0,48	19,8	0,22	0,44	17,2	0,26	0,33	56,9	0,79	1,25
20,9	0,41	0,19	100 g Digitoxin	20,9	1,40	0,47	21,0	1,56	0,36	17,6	0,63	0,02	59,5	3,59	0,85
21,5	0,47	0,31	0,1 cm³ Aqua dest.	20,3	0,27	0,45	18,8	0,18	0,41	18,1	0,17	0,48	57,2	0,62	1,34
19,7	0,45	0,28	50 γ k-Strophanthin	30,4	2,60	0,89	17,5	0,32	0,01	16,3	0,18	0,01	64,2	3,10	0,91

In dem Versuch der Tab. 1 erhielten weitere Tiergruppen Strophanthin und Digitoxin *subcutan*. Der Vergleich zeigt, daß die kaliuretische Wirkung der Glykoside bei subcutaner und i.v. Injektion etwa gleichstark ist. Bemerkenswert ist, daß die *Wasserdiurese* während der ersten beiden Stunden durch Strophanthin sowohl bei subcutaner, als auch bei i.v. Applikation mehr gesteigert wird als durch Digitoxin.

b) Thevetin. Das Glykosid Thevetin aus den Nußkernen der Thevetia neriifolia besitzt wie Digitoxin als Aglucon Digitoxigenin; es unterscheidet sich von Digitoxin nur durch den Zuckerrest, indem es statt mit 3 Molekülen Digitoxose mit einem Molekül Thevetose und 2 Molekülen Glucose verätherт ist. Thevetin soll im Gegensatz zu Digitoxin eine kürzere und weniger kumulierende Herzwirkung besitzen (Chen and L. Chen, Kramer), wurde aber bisher therapeutisch kaum angewandt.

In Versuchen an Ratten verursachte auch Thevetin eine Zunahme

der renalen Kaliumausscheidung. Überraschenderweise trat diese aber nicht akut auf wie nach Digitoxin oder Strophanthin, sondern erst 4—6 Std nach der subcutanen oder i.v. Injektion. Um die Wirkung verfolgen zu können, haben wir deshalb Versuche über 10—12 Std durchführen müssen. Die Abb. 1 stellt einen Versuch dar, in dem die Wirkung des Thevetins mit derjenigen des Digitoxins und Strophanthins verglichen wird. Bei den mit 50 γ/100 g Strophanthin und 100 γ/100 g Digitoxin subcutan behandelten Ratten erreicht die Kaliurie wie in dem Versuch der Tab. 1 im Verlauf von 2 Std ihr Maximum, um dann im weiteren Verlauf von 4 bzw. 6 Std abzuklingen. Nach Thevetin hingegen liegt das Maximum der Kaliumausscheidung erst in der 3. Harnportion, d. h. 4—6 Std nach der Injektion. Die Art der Injektion, ob subcutan oder i.v., ist ohne Einfluß auf den zeitlichen Verlauf der Wirkung. Thevetin ist etwa 4mal weniger wirksam als k-Strophanthin und halb so wirksam wie Digitoxin.

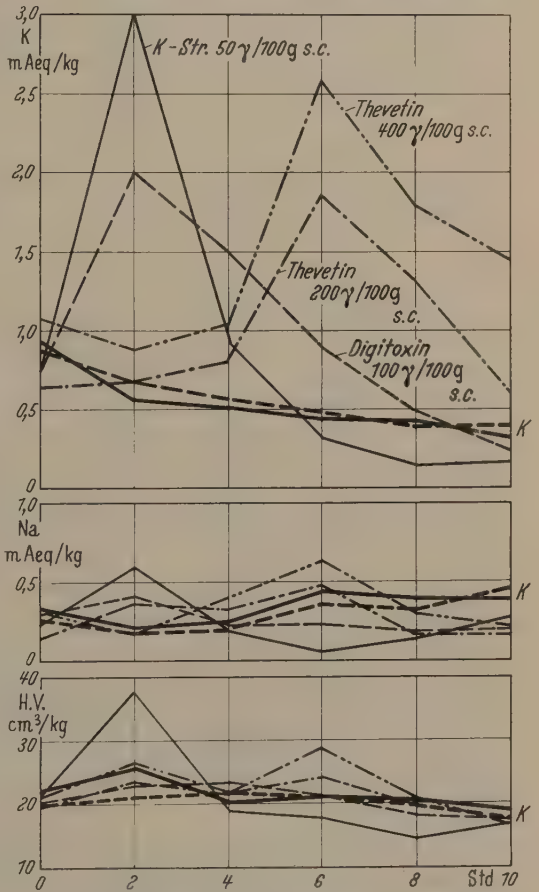


Abb. 1. *Die Wirkung von k-Strophanthin, Digitoxin und Thevetin (subcutan) auf die Kalium- und Natriumausscheidung sowie das Harnvolumen (H.V.) von Ratten.* Mittelwerte von je 2 Gruppen (8 Ratten). — *K* Kontrolltiere, denen 0,1 cm³/100 g Aqua dest. (——), bzw. 40%iges Äthanol (— —) s.c. injiziert wurde. (Für Einzelheiten siehe Methodik.) Akute Kaliurie nach Strophanthin und Digitoxin; Latenz der Thevetinwirkung (auch bei subcutaner Injektion!)

c) Neriifolin. Die *Latenz* der Thevetinwirkung spricht dafür, daß nicht das Glykosid selbst, sondern ein Metabolit die Kaliurie verursacht. Da Thevetin möglicherweise nur in dem Maße wirksam wird, als ein Abbau des Glykosidmoleküls unter Abspaltung von Zucker im Organismus erfolgt, haben wir Versuche mit Digitoxigenin und Neriifolin durchgeführt. Das Aglucon Digitoxigenin besaß in

Dosierungen bis zu 250 γ/100 g subcutan keinerlei kaliuretische Wirksamkeit. Das Spaltprodukt *Neriifolin* besteht aus Digitoxigenin und Thevetose; es unterscheidet sich von Thevetin lediglich dadurch, daß ihm die beiden im Thevetin vorhandenen Glucosemoleküle fehlen.

$$\overbrace{\underbrace{\text{Digitoxigenin}}_{\text{Neriifolin}} + \text{Thevetose} + \text{Glucose} + \text{Glucose}}^{\text{Thevetin}}$$

Der Versuch der Abb. 2 zeigt, daß Neriifolin im Gegensatz zu Thevetin eine *akute* Kaliurie verursacht und etwa 4mal wirksamer ist.

2. Orale Applikation

a) Digitoxin und Thevetin. Digitoxin ist ein auch bei oraler Verabfolgung zuverlässig wirkendes Glykosid. Dementsprechend fanden wir, daß es auch bei *oraler* Applikation die renale Kaliumausscheidung fördert. Vergleichsversuche, in denen Ratten verschiedene Digitoxindosen (50, 100 und 200 γ/100 g) oral bzw. subcutan erhielten, ergaben weder in der Wirkungsstärke noch im zeitlichen Verlauf der Kaliurie einen signifikanten Unterschied. Zu gleichen Ergebnissen führten Versuche mit *Thevetin*. Auch hier bestand kein Unterschied, ob das Glykosid subcutan oder oral gegeben wurde. Die Latenzzeit der Thevetinwirkung bis zum Einsetzen der Kaliurie betrug bei oraler wie bei subcutaner und i.v. Applikation 4 Std.

b) Neriifolin. Im Gegensatz zu Thevetin verursacht Neriifolin wie bei subcutaner, so auch bei oraler Applikation eine akute, innerhalb von 2 Std einsetzende Kaliurie. Vergleichsversuche, in denen wir die orale und subcutane Wirksamkeit des Neriifolins verglichen, führten zu dem Ergebnis, daß es bei oraler Verabreichung etwas weniger wirksam ist (siehe auch Tab. 3).

c) k-Strophanthin. Die enterale Resorption des Strophanthins ist, wie zahlreiche, auch neuere Untersuchungen ergeben haben, unsicher (siehe z. B. Lendle; Frank; Hildebrandt u. Dörner; Reinert; Zöllner u. Foth u. a.). In unseren Versuchen an Ratten waren Strophanthindosen von 50—100 γ, die — subcutan gegebenen — eine akute Kaliurie verursachten, oral unwirksam. Erst weit höhere Dosen wirkten. Aber auch bei hoher Dosierung trat die Wirkung niemals akut ein, sondern erst 2—6 Std nach der oralen Applikation. In dem Versuch der Abb. 3 erhielten je 2 Gruppen von Ratten *oral* 0,5 mg und 1 mg/100 g k-Strophanthin in 2 cm³ Aqua dest., andere zum Vergleich 50 γ/100 g k-Strophanthin *subcutan*. Selbst die hohe Dosis von 1 mg/100 g oral hat während der ersten 2 Std keinen Einfluß auf die

renale Kaliumausscheidung; die Wirkung setzt erst in der folgenden 2 Std-Periode ein und erreicht in der 3. Periode (4.—6. Std) ihr Maximum.

In der Tab. 2 sind die Ergebnisse von 3 Versuchen zusammengefaßt, die an verschiedenen Tagen und mit verschiedenen Tiergruppen durchgeführt wurden. Bei 4stündiger Versuchsdauer ist die renale Kaliumausscheidung bei den mit 50 γ k-Strophanthin *subcutan* behandelten

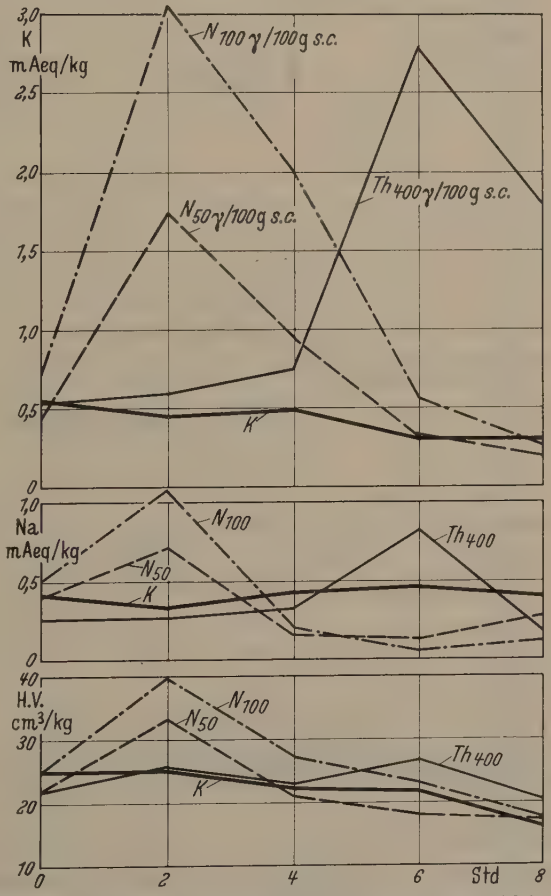


Abb. 2. *Die Wirkung von Neriifolin (N) und Thevetin (Th) nach subcutaner Injektion.* Mittelwerte aus 2 Gruppen (8 Ratten). *H.V.* Harnvolumen. *K* Kontrolltiere (0,1 cm³/100 g 10%iges Äthanol s.c.). Akute Wirkung des Neriifolins; Latenz der Thevetinwirkung

Ratten um 2,56 mAeq/kg gegenüber Kontrolltieren erhöht, während 0,5 und 1 mg *oral* noch keine signifikante Mehrausscheidung bewirken. Bei 8stündiger Versuchsdauer hingegen ist sie nach 0,5 mg oral um etwa 100% (1,66 Aeq) und nach 1 mg oral um etwa 300%

(4,56 Aeq) erhöht. Das bedeutet, daß k-Strophanthin während einer 8stündigen Beobachtungsperiode oral etwa 15mal weniger wirksam ist als subcutan.

Von besonderer Bedeutung ist die Frage, ob die *Streuung* bei oraler Applikation größer wird; denn Versuche an anderen Tierarten, in denen die orale Resorption durch anschließende i.v. Infusion, durch Bestimmung der sogenannten

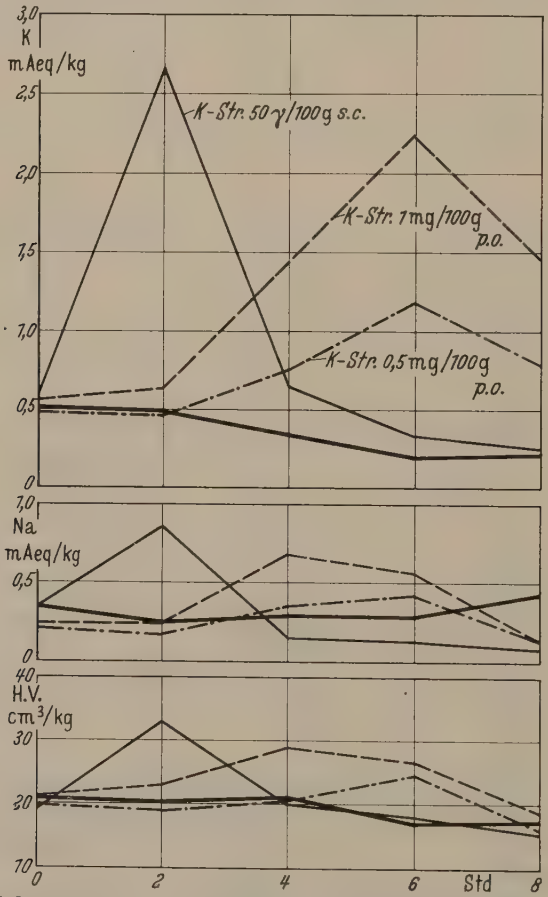


Abb. 3. *Vergleich der Wirkung von k-Strophanthin bei subcutaner und oraler Applikation* (siehe Text). *H.V.* Harnvolumen

Auffülldosis ermittelt wurde, ergaben Abweichungen bis zu 100%. Die Tab. 2 zeigt, daß die Streuung bei oraler Applikation kaum größer ist als bei subcutaner. Zu berücksichtigen ist allerdings, daß die Tiere alle 2 Std 2 cm³ Aqua dest. oral erhielten, was möglicherweise eine gleichmäßige Resorption begünstigt.

d) k-Strophanthin α, β und γ. Die Versuche mit Thevetin und Neriifolin hatten ergeben, daß der Zuckerrest für die kaliuretische

Tabelle 2. *Vergleich der renalen Kaliumausscheidung nach subcutaner und oraler Applikation von k-Strophanthin*

N Anzahl der Tiergruppen. In Klammern der mittlere Fehler des Mittelwertes

		Renale Kaliumausscheidung im Verlauf von			
		4 Std		8 Std	
N	k-Strophanthin/100 g	m Aeq/kg	Zunahme geg. Kontr. m Aeq/kg	m Aeq/kg	Zunahme geg. Kontr. m Aeq/kg
6	Kontr.	0,90 (± 0,14)		1,36 (± 0,17)	
6	50 γ subcutan	3,46 (± 0,20)	2,56	3,97 (± 0,26)	2,61
6	1 mg oral	1,56 (± 0,41)	0,66	5,92 (± 0,43)	4,56
4	0,5 mg oral	1,12 (± 0,18)	0,22	3,02 (± 0,39)	1,66

Wirkung der Glykoside sowohl bei subcutaner als peroraler Applikation von wesentlicher Bedeutung ist. Abspaltung der beiden unspezifischen Glucosemoleküle hatte zur Folge, daß das Glykosid ohne Latenzzeit und stärker wirkte. Abspaltung des spezifischen Zuckers — der Thevetose —, so daß nur noch Digitoxi*genin* übrig blieb, bedeutete einen Verlust an Wirksamkeit. Ähnlich wie Thevetin besitzt auch k-Strophanthin einen spezifischen Zucker, die *Cymarose*, und 1 bzw. 2 Glucosemoleküle:

k-Strophanthidin — Cymarose — Glucose — Glucose

k-Strophanthin α (Cymarin)

k-Strophanthin β

k-Strophanthin γ (Strophanthosid)

Nach ihrem Gehalt an Zucker werden sie als α, β und γ-Glucosid bezeichnet.

Subcutan gegeben, bestehen nur geringe Unterschiede: die beiden Glucose enthaltenden Glykoside k-Strophanthin γ (Strophanthosid) und k-Strophanthin β sind kaliuretisch etwa gleich wirksam, das glucosefreie k-Strophanthin α (Cymarin) ist etwas wirksamer (siehe auch Tab. 3). *Oral* gegeben, treten jedoch ähnlich wie beim Thevetin und Neriifolin deutliche Unterschiede auf: k-Strophanthin γ (Strophanthosid) und k-Strophanthin β waren in gleicher Weise wie das bisher verwandte Rohglykosid oral etwa 15mal weniger wirksam als bei subcutaner Injektion; auch bei ihnen verlief die Wirkung mit der charakteristischen Latenzzeit und begann erst nach 2 Std. K-Strophanthin α (Cymarin) hingegen führte auch *oral* zu einer *akuten* Kaliämie und war unter Berücksichtigung der Molekulargewichte 4—5mal wirksamer als die beiden anderen Strophanthinglykoside.

Die Abb. 4 stellt einen Versuch dar, in dem die Wirkung von k-Strophanthin γ (0,5 bzw. 1 mg/100 g) und 100 bzw. 200 γ/100 g k-Strophanthin α (Cymarin) bei oraler Applikation miteinander verglichen wird: nach 4—6 Std ist die durch k-Strophanthin α (Cymarin) verursachte

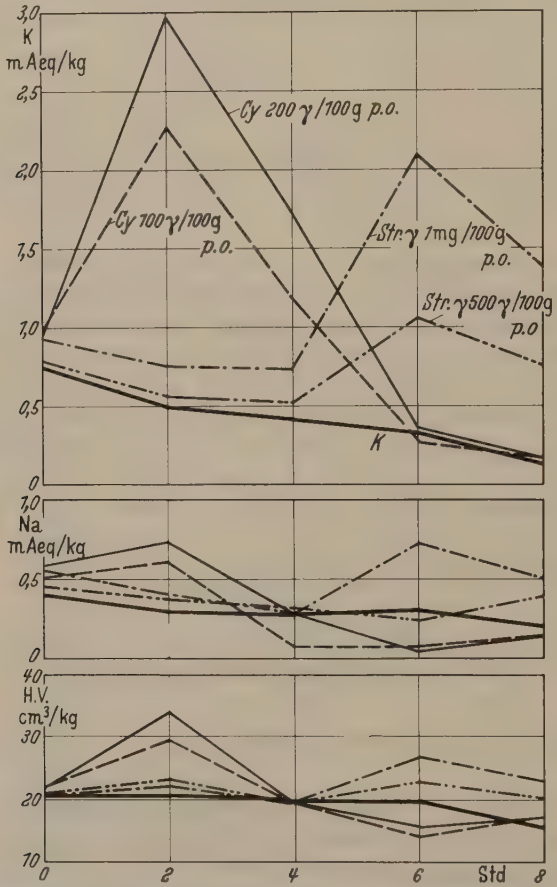


Abb. 4. *Die Wirkung von k-Strophanthin α (Cymarin) und k-Strophanthin γ bei oraler Applikation.* Mittelwerte aus 2 Gruppen (8 Ratten). — *K* Kontrolltiere; *Cy* Cymarin; *Str* k-Strophanthin γ. — *s.c.* subcutan; *p.o. oral*

Kaliämie bereits abgeklungen, während die Wirkung von k-Strophanthin γ (Strophanthosid) erst beginnt. Bemerkenswert ist, daß beide Glykoside oral auch eine dosisabhängige, wasserdiuretische Wirkung besitzen.

Parenteral verabfolgt, ist somit das glucosefreie Cymarin (k-Strophanthin α) nur wenig wirksamer als die glucosehaltigen β- und γ-Glykoside; *oral* ist es etwa 5mal wirksamer. Das spricht dafür, daß die im β- und

γ-Glucosid vorhandenen Glucosemoleküle für die *pharmakologische* Wirkung nicht so wesentlich sind, wohl aber für die *Resorption* aus dem Darm: die Latenzzeit der Wirkung bei oraler Verabfolgung und die geringe Wirksamkeit des β- und γ-Glykosids könnte dadurch bedingt sein, daß eine Resorption aus dem Magendarmkanal nur in dem Maße erfolgt, wie eine Abspaltung der Glucose und damit die Bildung des gut resorbierbaren Cymarins stattfindet. Das wird auch durch weitere Untersuchungen wahrscheinlich, in denen wir fanden, daß nach Schädigung der Bakterienflora des Darmes durch orale Gabe schlecht resorbierbarer Sulfonamide (Phthaloylsulfathiazol) oder Streptomycin die kaliuretische Wirkung von oral verabreichtem k-Strophanthin γ aufgehoben bzw. abgeschwächt ist, die von k-Strophanthin α aber erhalten bleibt (Greeff 1958).

Das *Aglucon* Strophanthidin war bei oraler Applikation in Dosen bis zu 2 mg/100 g, subcutan und intravenös in Dosen bis zu 250 γ/100 g absolut unwirksam. Der spezifische Zucker, die Cymarose, ist demnach für die kaliuretische Wirksamkeit des Cymarins ebenso notwendig wie die Thevetose für die Wirksamkeit des Neriifolins.

e) Convallatoxin und g-Strophanthin. Auf Grund der bisherigen Versuche waren die nur *ein* Zuckermolekül enthaltenden Glykoside *Cymarin* und *Neriifolin oral* gut wirksam. Es konnte deshalb auch von *Convallatoxin* und *g-Strophanthin* eine gute Wirksamkeit bei oraler Verabfolgung erwartet werden, da diese beiden Glykoside nur ein Molekül Rhamnose enthalten:

Convallatoxin = k-Strophanthidin + Rhamnose
g-Strophanthin = Ouabagenin + Rhamnose.

Entgegen unseren Erwartungen hatten jedoch *Convallatoxin* und *g-Strophanthin* bei oraler Applikation selbst in Dosen von 0,5 bzw. 2 mg/100 g keine kaliuretische Wirkung. Subcutan gegeben sind sie, wie wir schon in früheren Untersuchungen gefunden hatten (Bode u. Greeff), fast ebenso wirksam wie k-Strophanthin (siehe auch Tab. 3). Das spricht dafür, daß g-Strophanthin und Convallatoxin bei Ratten schlechter aus dem Darm resorbiert werden als Cymarin und Neriifolin; es steht jedoch im Gegensatz zu Ergebnissen an anderen Tierarten (Katzen und Hunden), wonach g-Strophanthin — gemessen an der Herzwirkung — sogar etwas besser resorbiert wird als k-Strophanthin (Rothlin, Krause, Moskopf). Die Diskrepanz ließe sich vielleicht dadurch erklären, daß auch in diesem Fall nicht die Glykoside Convallatoxin bzw. g-Strophanthin selbst resorbiert werden, sondern Metaboliten, die, wie z. B. das Aglucon k-Strophanthidin, noch herzwirksam, nicht aber kaliuretisch wirksam sind.

Chemisch unterscheidet sich Convallatoxin von dem oral gut wirksamen k-Strophanthin α (Cymarin) allein durch den Zuckerrest: das Aglucon Strophanthi*din* ist im einen Fall mit Rhamnose, im anderen mit Cymarose verätherт. Die Verätherung mit Rhamnose scheint demnach die Resorption zu verschlechtern, was dann auch die Unwirksamkeit des g-Strophanthins bei oraler Verabfolgung erklären würde. Die Cymarose ist ebenso wie Digitoxose, der spezifische Zucker des oral gut wirksamen Digitoxins, ein *Desoxyzucker*; die Rhamnose, der spezifische Zucker des g-Strophanthins und Convallatoxins, hingegen *nicht*.

Besprechung der Versuchsergebnisse

Die Versuche haben ergeben, daß alle untersuchten herzwirksamen Glykoside bei Ratten eine kaliuretische Wirksamkeit besitzen. Es bestehen jedoch sowohl quantitative Unterschiede als auch Unterschiede im zeitlichen Verlauf der Wirkung.

1. Um das Ausmaß der Kaliurie unabhängig vom zeitlichen Verlauf vergleichen zu können, haben wir in der Tab. 3 für jedes Glykosid die ED 2 m Aeq K errechnet, d. h. diejenige Dosis, die die renale Kaliumausscheidung um 2 m Aeq (78 mg) pro Kilogramm Tiergewicht gegenüber Kontrolltieren erhöht. Die Kaliumausscheidung unserer Kontrolltiere betrug bei 4stündiger Versuchsdauer (58 Tiergruppen) 0,96 (± 0,22) m Aeq/kg, bei 8stündiger Versuchsdauer (14 Tiergruppen) 1,44 (± 0,25) m Aeq/kg. Eine Mehrausscheidung von 2 m Aeq bedeutet deshalb für 4 Std eine etwa 200%ige, für 8 Std eine etwa 140%ige Steigerung.

Zur Ermittlung der ED 2 m Aeq K wurden die Ergebnisse sämtlicher Einzelversuche mit einem Glucosid in ein Ordinatenkreuz eingetragen, die Dosis im logarithmischen, die Zunahme der renalen Kaliumausscheidung im numerischen Maßstab. Durch die Punktschar wurde eine Gerade gelegt, deren Schnittpunkt mit 2 m Aeq K den Mittelwert der ED m Aeq K angibt. Die Streuung wurde aus der Abweichung der Einzelergebnisse von der Geraden errechnet.

Ratten sind bekanntlich besonders unempfindlich gegenüber der *Herz*wirkung von Strophanthin und Digitalisglykosiden. Trotzdem sind sie, wie Versuche von Heubner u. Nyary zeigten, zur titrimetrischen Bestimmung und zum Nachweis der Kumulation herzwirksamer Glykoside prinzipiell brauchbar. Vergleichsversuche, in denen wir die tödliche Dosis der von uns verwandten Glykoside durch i.v. Infusion bestimmten, ergaben, daß die ED 2 m Aeq K in jedem Fall weniger als 5% der tödlichen Dosis beträgt. Durch Bestimmung der renalen Kaliumausscheidung bietet sich somit die Möglichkeit, am nicht narkotisierten Tier die Wirkung von Glykosidmengen, die weit unter der letalen Dosis liegen, über längere Zeit zu verfolgen. Dabei ist allerdings noch ungewiß, ob und inwieweit die *kaliuretische* Wirkung der *cardiotoxischen* bzw. therapeutischen Wirkung bei den einzelnen Glykosiden parallel geht. Für den Nachweis der enteralen Resorption hingegen dürfte es gleichgültig

Tabelle 3. *Kaliuretische Wirkung bei subcutaner und oraler Applikation*

ED 2 mMol K Effektivdosis, die die renale Kalumausscheidung gegenüber Kontrolltieren um 2 m Aeq (78 mg) pro Kilogramm Tiergewicht erhöht. Die Zahlen in Klammern bedeuten die untere und obere Grenze der Streuung mit 19/20 Wahrscheinlichkeit. N Zahl der Tiergruppen (je 4 Tiere)

Glykosid (Mol. Gewicht)	subcutan			oral			Q s.c./p.o.
	N	ED 2 m Aeq K γ/100 g	Verlauf der Wirkung	N	ED 2 m Aeq K γ/100 g	Verlauf der Wirkung	
k-Strophanthin	52	42 (35—51)	Beginn und Ende der Wirkung innerhalb von 2 Std	14	530 (430—640)	Beginn nach 2 Std, Dauer mindestens 6 Std	0,08
k-Strophanthin γ (Strophanthosid) (872)	8	44 (34—59)		8	650 (520—795)		0,07
k-Strophanthin β (710)	4	46		6	660 (510—820)		0,07
k-Strophanthin α (Cymarin) (548)	12	35 (26—47)		18	105 (82—140)	Beginn innerhalb von 2 Std, Dauer 2—4 Std	0,33
Convallatoxin (550)	16	30 (21—42)		6	> 500	—	
g Strophanthin (584)	12	110 (88—132)		8	> 2000	—	
k-Strophanthidin (404)	10	> 250	—	6	> 2000	—	
Digitoxin (764)	18	96 (70—132)	Beginn innerhalb von 2 Std, Dauer 4—6 Std	12	86 (65—117)	wie subcutan	1,12
Thevetin (876)	14	205 (145—290)	Beginn nach 4 Std, Dauer 6—8 Std	10	184 (128—240)	wie subcutan	1,11
Neriifolin (534)	8	59 (47—72)	Beginn innerhalb von 2 Std, Dauer 2—4 Std	10	86 (62—122)	Beginn innerhalb von 2 Std, Dauer 4—6 Std	0,69
Digitoxigenin (374)	4	> 250	—	2	> 500	—	

sein, ob er auf Grund cardialer oder extracardialer Wirkungen erbracht wird.

2. Wie die Tab. 3 zeigt, bestehen zwischen den Glykosiden bei *subcutaner* Injektion signifikante Wirksamkeitsunterschiede: *g-Strophanthin* ist 2—3mal weniger wirksam als die k-Strophanthinglykoside; *Digitoxin* und *Thevetin* sind 2 bzw. 5mal weniger wirksam. *Neriifolin*, das wirksamste der Digitoxigeninglykoside, besitzt gegenüber k-Strophanthin keinen signifikanten Wirksamkeitsunterschied, wohl aber gegenüber Thevetin, von dem es sich nur durch das Fehlen von 2 Glucosemolekülen unterscheidet. Allen Digitoxigeninglykosiden ist gemeinsam, daß ihre Wirkung länger anhält als diejenige der Strophanthidinglykoside.

Die kaliuretische Wirkung des Digitoxins hält zwar länger an als die des k-Strophanthins, nicht jedoch so lange, wie man auf Grund der bekannten kumulierenden Wirkung annehmen sollte (Übersicht z. B. bei Lendle). Neuere Untersuchungen von Bine u. Mitarb. an Ratten, Kaninchen und Hunden ergaben, daß die Verweildauer des Digitoxins im Gewebe nur einige Stunden beträgt. Bei Ratten nahm z. B. der Digitoxingehalt nach i.v. Injektion (100 γ/100 g) im Herzen schon von der 1.—3. Std an und im *Skeletmuskel* nach der 6. Std stark ab. Nach 12 Std, war in diesen Organen kein Digitoxin mehr nachweisbar, Die kaliummobilisierende Wirkung des Digitoxins scheint demnach nur so lange zu dauern, wie das Glykosid im Gewebe vorhanden ist; kummulativ-toxische Wirkungen hingegen könnten auf einer *funktionellen* Kumulation im Sinne einer allobiotischen Wirkung (Heubner) beruhen.

Oral verabfolgt, verlieren die *Digitoxigenin*glykoside — Digitoxin, Thevetin und Neriifolin — nicht oder nur wenig (Neriifolin) an Wirksamkeit. Die *Strophanthidin* enthaltenden Glykoside hingegen sind bei oraler Applikation viel weniger wirksam als bei parenteraler Injektion. K-Strophanthin α (Cymarin) nimmt eine Sonderstellung ein, indem es bei oraler Verabfolgung am wenigsten an Wirksamkeit verliert und dann etwa 6mal — unter Berücksichtigung der Molekulargewichte 4—5mal — wirksamer ist als k-Strophanthin β und γ (siehe Tab. 3).

Cymarin, das zuerst aus dem kanadischen Hanf (Apocynum cannabicum) von Windaus u. Herrmann, später neben k-Strophanthin β und γ aus dem Samen von Strophanthus kombé isoliert wurde (Jakobs, Stoll), fand schon vor mehr als 30 Jahren zur Behandlung der Herzinsuffizienz Anwendung (Schubert, Allard, Bonsmann, v. Noorden). Die therapeutisch wirksamen Dosierungen betrugen 0,3—1 mg i.v. oder mehrmals täglich 0,3 mg oral. Nach tierexperimentellen Untersuchungen soll seine Herzwirkung von kürzerer Dauer sein bzw. weniger kumulieren als diejenige der glucoschaltigen Strophanthinglykoside (Kuroda, Hoffmann, Lendle u. Puhlmann).

3. Die pharmakologische Wirkung oral verabreichter Glykoside ist nicht nur von der Resorption schlechthin und vom Ausmaß der Zerstörung im Darm abhängig, sondern vor allem von der Resorptions*geschwindigkeit* bzw. von dem Verhältnis zwischen *Resorptions-* und *Eliminationsgeschwindigkeit*. Je langsamer ein Glykosid resorbiert und je schneller es eliminiert wird, um so geringer wird seine pharmakologische

Wirkung sein; schließlich wird die Schwellenkonzentration nicht mehr erreicht, weil Elimination und Resorption unterhalb der Wirksamkeitsschwelle miteinander Schritt halten. Das verdient besondere Berücksichtigung, wenn man am narkotisierten Tier die enterale Resorption durch anschließende Infusion und Auffüllung bis zum Herzstillstand nachweisen will. Jeder Unterschied in der Resorptionsgeschwindigkeit — individuell, artspezifisch oder auch durch die Narkose bedingt — hat deshalb besonders bei kurzwirkenden Glykosiden zur Folge, daß zum Zeitpunkt der Titration nicht nur verschiedene Mengen resorbiert sind, sondern auch ein verschiedener Prozentsatz des resorbierten Glykosids eliminiert ist:

Digitoxin ist in unseren Versuchen oral und subcutan gleich wirksam; auch der Wirkungs*verlauf* bleibt gleich (4—6 Std). Alle anderen Glykoside sind bei oraler Verabfolgung schwächer wirksam als bei parenteraler. Dabei scheint die Resorption aus dem Magen-Darmtrakt ziemlich gleichmäßig zu erfolgen; denn die Streuung der kaliuretischen Wirkung ist nach oraler Applikation nicht wesentlich größer als nach subcutaner Injektion. Die schwächere orale Wirksamkeit dürfte deshalb vorwiegend durch eine Verschiebung des Verhältnisses zwischen Resorptions- und Eliminationsgeschwindigkeit bedingt sein. Am deutlichsten ist das beim k-Strophanthin β und γ: Die Resorption beträgt 6—8 Std, die Elimination dagegen findet schnell statt. Dabei ist die Wirkung des k-Strophanthin γ auf 7%, des k-Strophanthin α auf 33% und des Neriifolins auf 69% der subcutanen Wirksamkeit vermindert (Tab. 3 „Q"). Der Prozentsatz der *resorbierten* Glykosidmenge hingegen dürfte wesentlich höher liegen.

4. Die Bedeutung des Zuckerrestes für die enterale Resorption und Wirksamkeit der Glykoside lassen besonders 2 Befunde erkennen: 1. beim *k-Strophanthin* verzögern bei oraler Verabfolgung die Glucosereste den Eintritt der Wirkung; 2. beim *Thevetin* verzögern sie ihn sowohl bei enteraler als bei parenteraler Applikation. Eine Abspaltung der Glucosereste, so daß nur noch der spezifische Zucker übrig bleibt, führt daher nicht nur zu einer Wirksamkeitssteigerung, sondern hebt auch die Latenz der Wirkung auf. Die nach k-Strophanthin bei *oraler* und nach Thevetin sowohl bei oraler als parenteraler Verabfolgung zu beobachtende *Latenzzeit* ließe sich dadurch erklären, daß in einem Fall (k-Strophanthin) eine Abspaltung der Glucosereste der Resorption aus dem Darm, im anderen Fall (Thevetin) auch dem Wirkungseintritt bei subcutaner bzw. intravenöser Injektion voraufgeht. Das wird auch durch Untersuchungen von Engler, Holtz u. Raudonat wahrscheinlich, in denen sich zeigen ließ, daß bei Inkubation von Rattenkot mit k-Strophanthin γ das glucosefreie Cymarin entsteht, und daß nach oraler Gabe von k-Strophanthin γ bzw. Thevetin die glucosefreien Spaltprodukte — Cymarin bzw. Neriifolin — mit dem Harn und Kot ausgeschieden werden.

Zusammenfassung

Vergleichende Untersuchungen über die kaliuretische Wirkung verschiedener Glykoside des Strophanthidins und Digitoxigenins haben zu folgenden Ergebnissen geführt:

1. Bei *subcutaner* Injektion besitzen alle untersuchten Glykoside eine dosisabhängige kaliuretische Wirkung. Die ED 2 m Aeq K, d. h. die Dosis, welche die renale Kaliumausscheidung um 2 m Aeq/kg gegenüber den Kontrolltieren erhöht, beträgt weniger als 5% der tödlichen Dosis. Zwischen den Glykosiden des Strophanthidins (k-Strophanthin, Convallatoxin) und denen des Digitoxigenins (Digitoxin, Thevetin) bestehen signifikante Wirksamkeitsunterschiede. K-Strophanthin ist wirksamer als g-Strophanthin. Die Genine sind auch bei 5—10fach höherer Dosierung unwirksam.

2. Bei *oraler* Applikation ist die Wirkung des k-Strophanthin β und γ auf 7%, des k-Strophanthin α (Cymarin) auf 33% der subcutanen Wirksamkeit vermindert, während die Glykoside des Digitoxigenins (Digitoxin, Thevetin, Neriifolin) nicht oder nur wenig an Wirksamkeit verlieren. g-Strophanthin und Convallatoxin sind selbst bei 20fach höherer Dosierung oral unwirksam.

3. Die durch k-Strophanthin γ und Thevetin bei oraler Verabfolgung verursachte kaliuretische Wirkung besitzt eine mehrstündige *Latenzzeit*, die der Wirkung der glucosefreien Spaltprodukte — Cymarin, Neriifolin — fehlt. Diese Latenzzeit der Wirkung findet sich beim Thevetin auch nach subcutaner Injektion. Die Erklärung könnte sein, daß der *Resorption* des Strophanthins und Thevetins aus dem Darm und dem *Wirksamwerden* des Thevetins nach parenteraler Injektion eine Abspaltung der beiden Glucosemoleküle vorausgehen muß.

Fräulein Gisela Thielecke danke ich für ihre Hilfe bei der Durchführung der Versuche.

Literatur

Allard, E.: Dtsch. med. Wschr. **1913**, 782.
Bine, R., M. Friedmann, S. O. Byers and C. Bland: Circulation **4**, 105 (1951); **6**, 367 (1952).
Bode, H., u. K. Greeff: Naunyn-Schmiedeberg's Arch. exp. Path. Pharmak. **227**, 436 (1956).
Bonsmann, M. R.: Dtsch. med. Wschr. **1914**, 1518.
Chen, K. K., and A. Ling Chen: J. Pharmacol. exper. Ther. **51**, 23 (1934).
Engler, R., P. Holtz u. H. W. Raudonat: Naunyn-Schmiedeberg's Arch. exp. Path. Pharmak. **233**, 393 (1958).
Frank, H. R.: Med. Mschr. **4**, 820 (1950).
Greeff, K.: Verh. dtsch. Ges. Kreisl.-Forsch. **22**, 312 (1956). — Dtsch. med. Wschr. **1956**, 666.
Greeff, K.: Naunyn-Schmiedeberg's Arch. exp. Path. Pharmak. **231**, 391 (1957).
Greeff, K.: Verh. dtsch. Ges. Kreisl.-Forsch. (1958) (im Druck).

Heubner, W., u. A. v. Nyray: Naunyn-Schmiedeberg's Arch. exp. Path. Pharmak. **177**, 60 (1934).
Hildebrandt, F., u. J. Dörner: Klin. Wschr. **1951**, 372.
Hoffmann, H.: Naunyn-Schmiedeberg's Arch. exp. Path. Pharmak. **96**, 105 (1923).
Jakobs, W. A.: J. biol. Chem. **57**, 569 (1923); **67**, 609 (1926).
Kramer, M.: Naunyn-Schmiedeberg's Arch. exp. Path. Pharmak. **224**, 348 (1955).
Krause D.: Arzneimittel-Forsch. **5**, 428 (1955).
Kuroda M.: Zschr. ges. exp. Med. **4**, 55 (1916).
Kuschinsky, G., u. H. Langecker: Biochem. Z. **318**, 164 (1948).
Lendle, L.: Handbuch d. Pharmakologie, Erg. Wk. 1 (1935).
Lendle, L., u. H. Puhlmann: Naunyn-Schmiedeberg's Arch. exp. Path. Pharmak. **190**, 296 (1938).
Lendle, L.: Dtsch. med. Wschr. **1950**, 797.
Moskopf, E., u. H. Dietz: Medizinische **1955**, 1375.
Noorden, C., v.: Thér. Mh. **30**, 14 (1916).
Reinert, H.: Naunyn-Schmiedeberg's Arch. exp. Path. Pharmak. **215**, 1 (1952).
Rothlin, E., u. R. Bircher: Ergebn. inn. Med. Kinderheilk. **5**, 483 (1954).
Schubert, M. E.: Dtsch. med. Wschr. **1913**, 540.
Stoll, A., J. Renz u. W. Kreis: Hev. chim. Acta **20**, 1484 (1938).
Windaus, A., u. L. Herrmann: Ber. dtsch. chem. Ges. **48**, 979 (1915).
Zöllner, G., u. K. Foth: Naunyn-Schmiedeberg's Arch. exp. Path. Pharmak. **216**, 196 (1952).

Priv.-Doz. Dr. med. K. Greeff, Pharmakologisches Institut der Universität Frankfurt a. M., Ludwig Rehn-Str. 14

Arch. exper. Path. u. Pharmakol., Bd. 233, S. 484—494 (1958)

Aus dem Pharmakologischen Institut der Universität Tübingen

Kreisprozeß der Hämiglobinbildung durch Benzylphenylhydroxylamin und Benzalphenylnitron

Von
MANFRED KIESE und KARL-HEINZ PLATTIG

Mit 7 Textabbildungen

(Eingegangen am 12. Februar 1958)

Aus den Ergebnissen einer Reihe unserer Untersuchungen ist zu schließen, daß die Oxydation einer Vielzahl von Äquivalenten Hämoglobin durch jede Molekel Phenylhydroxylamin oder Nitrosobenzol in roten Zellen in vivo und in vitro sowie die starke Beschleunigung der Sauerstoffaufnahme roter Zellen durch die beiden Substanzen auf zwei Reaktionen beruhen: der gekoppelten Oxydation von Hämoglobin und Phenylhydroxylamin durch Sauerstoff zu Hämiglobin und Nitrosobenzol und der enzymischen Reduktion von Nitrosobenzol zu Phenylhydroxylamin.

Wir haben untersucht, ob es andere Paare von Substanzen gibt, die wie Phenylhydroxylamin und Nitrosobenzol einen enzymischen Kreisprozeß der Hämiglobinbildung ermöglichen. Im Benzylphenylhydroxylamin und Benzalphenylnitron

fanden wir ein Paar von Substanzen, das ebenso wirkt wie Phenylhydroxylamin und Nitrosobenzol.

Methoden

Phenylhydroxylamin wurde nach UTZINGER dargestellt.

Benzalphenylnitron wurde nach BAMBERGER durch Umsetzung von Phenylhydroxylamin mit Benzaldehyd erhalten.

Benzylphenylhydroxylamin wurde zum Teil durch Hydrierung von Benzalphenylnitron nach CUSMANO dargestellt; die Ausbeute war schlecht. In besserer Ausbeute wurde es nach UTZINGER durch Umsetzungen von Phenylhydroxylamin mit Benzylchlorid erhalten. Die Reinigung des Rohproduktes bis zum F = 86° erforderte mehrmaliges Umkristallisieren aus heißem Alkohol.

Hämoglobinlösungen wurden aus gewaschenen roten Zellen vom Hunde durch Hämolyse mit Wasser und hochtouriges Zentrifugieren hergestellt.

Hämiglobinlösungen wurden hergestellt durch Zugabe von Natriumnitrit zu gewaschenen roten Zellen vom Hunde, Entfernung des überschüssigen Nitrits durch mehrmaliges Waschen der Zellen mit 0,9%iger Natriumchlorid-Lösung, Hämolyse der braunen Zellen mit Wasser und hochtouriges Zentrifugieren.

Rote Zellen wurden aus Hunde-Blut durch Abtrennen des Blutplasma und mehrmaliges Waschen mit 0,9%iger Natriumchlorid-Lösung gewonnen. Für die Untersuchungen wurden sie in Phosphat-Ringer-Lösung (Gemisch aus 9 Teilen einer Lösung von 8,5 g Natriumchlorid, 0,23 g Kaliumchlorid, 0,25 g Calciumchlorid in 1 l und 1 Teil Phosphat 0,067 mol p_H 7,4) suspendiert.

Tierversuche wurden ausschließlich an Hunden durchgeführt. Benzylphenylhydroxylamin und Benzalphenylnitron wurden in Aceton gelöst i.v. injiziert. Da die Injektion von Aceton schmerzhaft ist, wurde den Hunden vor der Verabreichung des Acetons Evipan-Natrium-Lösung in einer eben zur Narkose ausreichenden Dosis i.v. injiziert.

Die *Aufnahme von Sauerstoff* durch rote Zellen wurde manometrisch in der Apparatur von Warburg bestimmt. Wenn in den untersuchten Zellen Hämiglobin gebildet wurde, dann wurde die Hämiglobinbildung in einem zweiten gleichartigen Ansatz gemessen, damit aus den Ergebnissen der Manometrie und dem bei der Umwandlung von Oxyhämoglobin in Hämiglobin freigesetzten Sauerstoff der Sauerstoffverbrauch der Zellen ermittelt werden konnte.

Bestimmung des Hämiglobins erfolgte durch Messung der Extinktionszunahme in Lösung vom p_H 6,8 bei 550 mμ nach Zugabe von Cyanid. Die Konzentration des Gesamt-Blutfarbstoffs wurde nach Oxydation des Hämoglobins mit Ferricyanid durch Hämiglobinbestimmung ermittelt.

Optische Messungen wurden mit den Spektralphotometern Modell DU und DK-1 von Beckman und dem Spektralphotometer von Zeiss durchgeführt.

Ergebnisse

1. Reaktion von Benzylphenylhydroxylamin mit Blutfarbstoff

Die Reaktion von Benzylphenylhydroxylamin mit Hämoglobin und Sauerstoff wurde in Lösungen von $6 \cdot 10^{-5}$ Äquivalent Hämoglobin je Liter Phosphatlösung 0,02 mol p_H 7,2 bei 20° C unter Luft gemessen. Mit 0,04 ml Aceton, in dem das Benzylphenylhydroxylamin gelöst war, wurden 3 ml Hämoglobinlösung durch Einspritzen in die Meßküvette schnell vermischt. Die Abnahme der Extinktion bei 580 mμ wurde in Spektralphotometer Modell DK-1 von Beckman registriert.

Aus der Anfangsgeschwindigkeit der Extinktionsänderung ergab sich die Geschwindigkeit der Hämiglobinbildung bei der Konzentration des Benzylphenylhydroxylamins von $5 \cdot 10^{-5}$ Mol/l zu $1{,}5 \cdot 10^{-6}$ Äquivalent $\cdot l^{-1} \cdot sec^{-1}$ und bei der Konzentration von 10^{-4} Mol/l zu $3 \cdot 10^{-6}$ Äquivalent $\cdot l^{-1} \cdot sec^{-1}$. Für die Reaktion von Phenylhydroxylamin mit Hämoglobin unter gleichen Bedingungen wurde in Übereinstimmung mit früheren Messungen (Kiese u. D. Reinwein) bei $2{,}5 \cdot 10^{-5}$ Mol Phenylhydroxylamin je Liter die Geschwindigkeit der Hämiglobinbildung zu 10^{-6} Äquivalent $\cdot l^{-1} \cdot sec^{-1}$ und bei $5 \cdot 10^{-5}$ Mol/l zu $2 \cdot 10^{-6}$ Äquivalent $\cdot l^{-1} \cdot sec^{-1}$ gefunden.

Unter den beschriebenen Bedingungen reagierte Benzylphenylhydroxylamin nur wenig langsamer mit Hämoglobin und Sauerstoff als Phenylhydroxylamin. Das Verhältnis der Reaktionsgeschwindigkeit des Benzylphenylhydroxylamins zu der des Phenylhydroxylamins betrug 0,75.

Die Reduktion von Hämiglobin durch Benzylphenylhydroxylamin wurde unter Kohlenoxyd gemessen. Die Zunahme der Extinktion bei

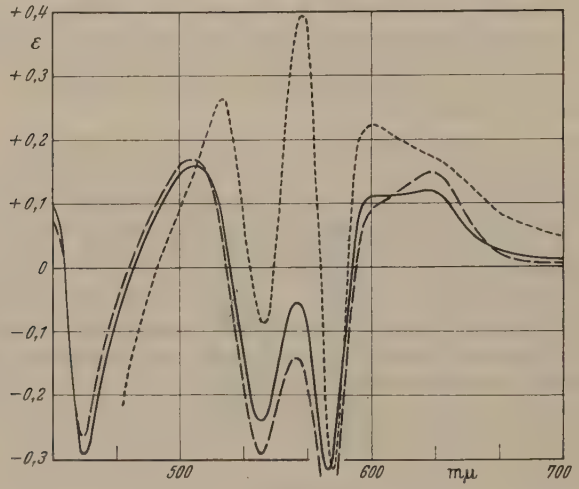


Abb. 1. Differenz-Spektren (400—700 mμ) von 1. Benzalphenylnitron-Hämoglobin (+ Hämiglobin) gegen Oxyhämoglobin ——; 2. Hämiglobin gegen Oxyhämoglobin — —; 3. Nitrosobenzol-Hämoglobin gegen Oxyhämoglobin - - - - Blutfarbstoff-Konzentration bei 1. und 2. $3 \cdot 10^{-4}$ Äquivalent je Liter, bei 3. $2 \cdot 10^{-5}$ Äquivalent je Liter in 0,01 mol Phosphat p_H 6,8. Im Ansatz 1 waren $5 \cdot 10^{-3}$ Mol Benzalphenylnitron je Liter enthalten; die Konzentration an Benzalphenylnitron-Hämoglobin war unbekannt. Im Ansatz 2 war nur soviel Hämiglobin gebildet worden, daß die Differenz-Extinktion bei 600 mμ der im Ansatz 1 fast gleich war. Im Ansatz 3 war das Hämoglobin durch einen Überschuß von Nitrosobenzol vollständig in Nitrosobenzol-Hämoglobin verwandelt

580 mμ durch Umwandlung von Hämiglobin in Kohlenoxyd-Hämoglobin war das Maß der Reaktionsgeschwindigkeit. Bei den Konzentrationen von 10^{-4} Äquivalent Hämiglobin und $8 \cdot 10^{-4}$ Mol Benzylphenylhydroxylamin je Liter wurde Hämiglobin mit der Geschwindigkeit von $1{,}5 \cdot 10^{-6}$ Äquivalent $\cdot\, l^{-1} \cdot sec^{-1}$ reduziert. Phenylhydroxylamin reduziert Hämiglobin unter gleichen Bedingungen mit der Geschwindigkeit von $2{,}3 \cdot 10^{-6}$ Äquivalent $\cdot\, l^{-1} \cdot sec^{-1}$ (Kiese u. I. Reinwein).

2. Reaktion von Benzalphenylnitron mit Blutfarbstoff

Zugabe von Benzalphenylnitron zur Lösung von Oxyhämoglobin bewirkte eine sehr langsame Oxydation des Hämoglobins. In einer Lösung von $7{,}6 \cdot 10^{-5}$ Äquivalent Hämoglobin je Liter 0,01 mol Phosphatlösung vom p_H 6,8 wurden durch $4 \cdot 10^{-3}$ Mol Benzalphenylnitron je

Liter bei 20° C $4 \cdot 10^{-9}$ Äquivalent Hämiglobin $\cdot l^{-1} \cdot sec^{-1}$ gebildet. Die Reaktion des Benzylphenylhydroxylamins mit Hämoglobin und Sauerstoff verlief etwa 10^5mal so schnell.

In Hämoglobinlösungen, deren Extinktion in der Schichte von 0,5 bis 1 cm gut meßbar ist, war die Bildung einer Verbindung zwischen Benzalphenylnitron und Blutfarbstoff nicht sicher festzustellen. Durch hohe Konzentrationen von Benzalphenylnitron wurden in der Zeit zwischen Mischung und Beendigung der Messung schon störende Konzentrationen

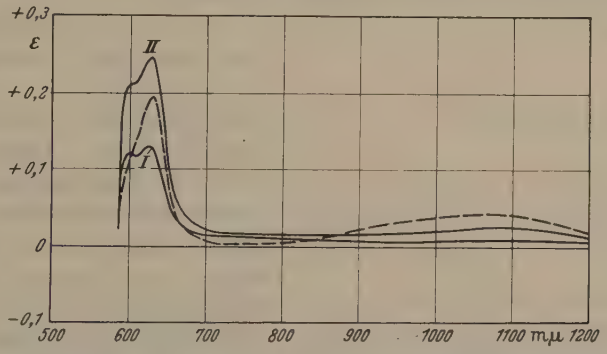


Abb. 2. Differenzspektren (600—1200 mμ) von 1. Benzalphenylnitron-Hämoglobin gegen Oxyhämoglobin —— und 2. Hämiglobin gegen Oxyhämoglobin — —. Kurve *I* unmittelbar nach der Mischung von Hämoglobin und Benzalphenylnitron; Kurve *II* 10 min später. Im Ansatz 2 wurde nur soviel Hämiglobin gebildet, daß die Differenz-Extinktion bei 600 mμ der im Ansatz 1, Kurve *I*, gleich war. Blutfarbstoffkonzentration $4 \cdot 10^{-4}$ Äquivalent je Liter in 0,01 mol Phosphat, p_H 6,8

von Hämiglobin gebildet. Benzalphenylnitron bildete also nicht wie Nitrosobenzol mit Hämoglobin eine Verbindung von geringerer Dissoziation als Oxyhämoglobin.

Die Bildung einer Verbindung von Hämoglobin und Benzalphenylnitron konnte aber in Hämoglobinlösungen höherer Konzentration mit Hilfe des Differenzspektrums nachgewiesen werden.

In Abb. 1 ist das Differenzspektrum zwischen einer Lösung von Hämoglobin mit Benzalphenylnitron und der gleichen Lösung ohne Benzalphenylnitron wiedergegeben. Von einer Hämoglobinlösung in 0,01 mol Phosphat p_H 6,8 wurden je 10 ml mit 1 ml Aceton bzw. 1 ml Aceton, das Benzalphenylnitron enthielt, gemischt. Nach 40 sec wurde mit der Aufnahme des Differenzspektrums von 700—400 mμ im registrierenden Spektralphotometer Modell DK 1 von Beckman begonnen; Dauer der Messung 7½ min. Die Konzentration des Hämoglobins in der gemessenen Lösung betrug $3 \cdot 10^{-4}$ Äquivalent je Liter und die des Benzalphenylnitrons $5 \cdot 10^{-3}$ Mol/l.

Da in den untersuchten Ansätzen sogleich nach der Mischung von Oxyhämoglobin und Benzalphenylnitron infolge der hohen Konzentration der beiden Substanzen eine meßbare Hämiglobinbildung begann,

war das aufgezeichnete Differenzspektrum nicht das reine Differenzspektrum Benzalphenylnitron-Hämoglobin gegen Oxyhämoglobin, sondern das eines Gemisches von Benzalphenylnitron-Hämoglobin und Hämiglobin gegen Oxyhämoglobin. Außerdem änderte sich das Differenzspektrum dauernd infolge der fortschreitenden Hämiglobinbildung. Die Anwesenheit von Hämiglobin in dem untersuchten Ansatz zur Zeit der Aufnahme des Differenzspektrums ist an der Ausbildung eines Maximums bei 630 mμ bereits erkennbar.

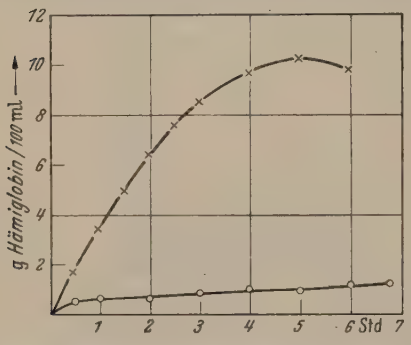


Abb. 3. Hämiglobinbildung durch Benzylphenylhydroxylamin in roten Zellen vom Hunde ohne und mit Glucose. Gewaschene rote Zellen vom Hunde, 15 g Hämoglobin je 100 ml, in Phosphat-Ringer-Lösung vor den Zusätzen 2 Std bei 37° C gehalten. o——o Zusatz von $2 \cdot 10^{-4}$ Mol Benzylphenylhydroxylamin je Liter. ×——× Zusatz von $2 \cdot 10^{-4}$ Mol Benzylphenylhydroxylamin + 2 g Glucose je Liter

Eine weitere Verbindung neben Hämiglobin in der mit Benzalphenylnitron versetzten Hämoglobinlösung ist aus dem Vergleich ihres Differenzspektrums mit dem des Hämiglobins erkennbar. In einer Hämoglobinlösung von der gleichen Konzentration, die für die Messungen mit Benzalphenylnitron verwandt worden war, wurde durch Ferricyanid soviel Hämiglobin erzeugt, daß das Differenzspektrum dem der mit Benzalphenylnitron versetzten Hämoglobinlösung ähnlich war. Dieses Differenzspektrum Hämiglobin gegen Oxyhämoglobin ist in Abb. 1 ebenfalls wiedergegeben. Es ist mit dem Differenzspektrum der mit Benzalphenylnitron versetzten Hämoglobinlösung gegen Oxyhämoglobin nicht identisch.

Abweichungen zwischen den beiden Differenzspektren waren ferner im Bereich zwischen 800 und 1200 mμ vorhanden. Kurz nach der Mischung von Benzalphenylnitron und Hämoglobin war die Extinktionsdifferenz bei 1080 mμ sehr gering und betrug nur einen Bruchteil der Extinktionsdifferenz einer Hämiglobinlösung, die bei 600 mμ die gleiche Extinktionsdifferenz hatte wie eine Hämoglobinlösung mit Benzalphenylnitron. In Abb. 2 ist das Differenzspektrum Benzalphenylnitron-Hämoglobin gegen Oxyhämoglobin kurz nach der Mischung und 10 min später für den Bereich von 600—1200 mμ wiedergegeben, dazu ein Differenzspektrum Hämiglobin gegen Oxyhämoglobin, das bei 600 mμ fast die gleiche Extinktionsdifferenz aufweist wie das erste Differenzspektrum Benzalphenylnitron-Hämoglobin gegen Oxyhämoglobin.

In der Abb. 1 ist ferner ein Differenzspektrum Nitrosobenzol-Hämoglobin gegen Oxyhämoglobin wiedergegeben. Nitrosobenzol war

zur vollständigen Sättigung des Hämoglobins in geringem Überschuß zugesetzt worden. Die Hämoglobinlösung war zuvor soweit verdünnt worden, daß das Differenzspektrum zwischen reinem Nitrosobenzol-Hämoglobin und Oxyhämoglobin in dem verfügbaren Meßbereich erfaßt wurde.

Aus den mitgeteilten optischen Daten ist zu erkennen, daß Benzalphenylnitron mit Hämoglobin eine Verbindung bildet, und es ist zu vermuten, daß ihr Absorptionsspektrum dem des Nitrosobenzol-Hämoglobins ähnlich ist. Die Affinität des Benzalphenylnitrons zu Hämoglobin ist viel geringer als die Affinität des Nitrosobenzols zu Hämoglobin.

3. Wirkungen von Benzylphenylhydroxylamin und Benzalphenylnitron in roten Zellen in vitro

Wurde gewaschenen roten Zellen, die ohne Zugabe von Glucose 2 Std bei 37° C gehalten worden waren, Benzylphenylhydroxylamin zugesetzt, so wurde wie in Hämoglobinlösungen nur eine geringe Menge Hämiglobin

Tabelle 1. *Maximale Hämiglobinkonzentrationen in roten Zellen vom Hunde, die durch Einwirkung von Benzylphenylhydroxylamin und Benzalphenylnitron sowie von Phenylhydroxylamin und Nitrosobenzol in vitro erreicht wurden*

Rote Zellen in Phosphat-Ringer-Lösung mit 0,2% Glucose unter Luft. Temp. 37° C

Substanz	Konz. Mol/l	$\frac{Hb^{III}}{Hb^{III}+Hb^{II}}$
Benzylphenylhydroxylamin oder Benzalphenylnitron	$2 \cdot 10^{-4}$	$0{,}72 \pm 0{,}02$
	$2 \cdot 10^{-3}$	$0{,}90 \pm 0{,}02$
Phenylhydroxylamin oder Nitrosobenzol*	$2 \cdot 10^{-4}$	0,73
	$2 \cdot 10^{-3}$	0,90

* Daten für Phenylhydroxylamin und Nitrosobenzol nach Kiese, Reinwein u. Waller.

gebildet. Zellen, die Glucose erhalten hatten, bildeten nach Zugabe von Benzylphenylhydroxylamin oder Benzalphenylnitron Hämiglobin in solchen Mengen, daß von jeder Molekel Benzylphenylhydroxylamin oder Benzalphenylnitron eine Vielzahl von Äquivalenten Hämiglobin gebildet worden war (siehe Abb. 3). Die Wirkung von Benzylphenylhydroxylamin und Benzalphenylnitron war gleich. Durch die beiden Substanzen wurden die gleichen Erhöhungen der Hämiglobinkonzentration in den roten Zellen erzielt wie durch gleiche Konzentrationen von Phenylhydroxylamin oder Nitrosobenzol; siehe Tab. 1.

Die Hämiglobinbildung durch Benzylphenylhydroxylamin und Benzalphenylnitron in roten Zellen verlief laugsamer als die durch

Phenylhydroxylamin und Nitrosobenzol. Während die maximale Konzentration des Hämiglobins durch die Wirkung von Phenylhydroxylamin oder Nitrosobenzol in 1—2 Std erreicht wurde (Kiese, Reinwein u. Waller) dauerte es 3—5 Std, bis durch äquimolare Konzentrationen von Benzylphenylhydroxylamin oder Benzalphenylnitron die maximale Konzentration an Hämiglobin erreicht wurde.

In Abb. 4 ist der Ablauf der Hämiglobinbildung durch Nitrosobenzol nach Daten von Kiese, Reinwein u. Waller mit dem durch Benzylphenylhydroxylamin und Benzalphenylnitron verglichen.

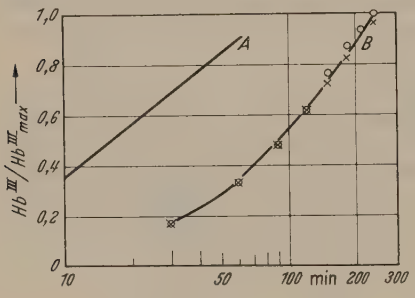


Abb. 4

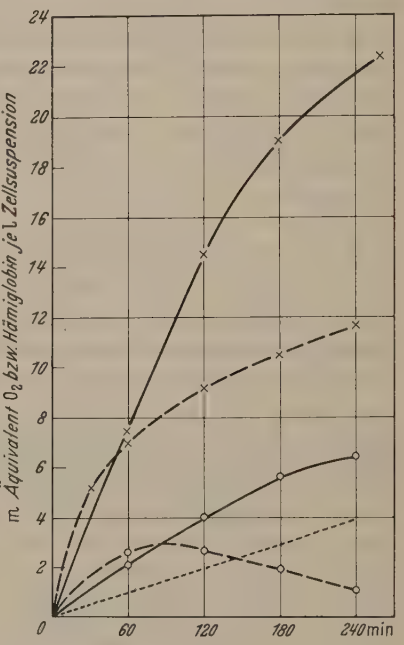


Abb. 5

Abb. 4. Ablauf der Hämiglobinbildung in roten Zellen vom Hunde in Phosphat-Ringer-Lösung p_H 7,4 mit 0,2% Glucose bei 37° C durch $2 \cdot 10^{-4}$ Mol Benzylphenylhydroxylamin (o o o) und $2 \cdot 10^{-4}$ Mol Benzalphenylnitron (× × ×) je Liter (Kurve *B*) sowie durch $1{,}2 \cdot 10^{-4}$ Mol Nitrosobenzol je Liter (Kurve *A*). Ordinate: Hämiglobinkonzentration zur Zeit der Abszisse im Verhältnis zur maximalen Hämiglobinkonzentration. Daten für Nitrosobenzol (Kurve *A*) nach Kiese, Reinwein u. Waller

Abb. 5. Aufnahme von Sauerstoff und Hämiglobinbildung in roten Zellen vom Hunde nach Zugabe von Benzylphenylhydroxylamin, Benzalphenylnitron und Nitrosobenzol. Zellsuspension mit 16 g Hämoglobin je 100 ml in Phosphat-Ringer-Lösung p_H 7,4 mit 0,2% Glucose bei 37° C. ×——× Sauerstoffaufnahme unter der Wirkung von $2 \cdot 10^{-4}$ Mol Benzylphenylhydroxylamin bzw. Benzalphenylnitron je Liter. o——o Hämiglobinbildung durch $2 \cdot 10^{-4}$ Mol Benzylphenylhydroxylamin bzw. Benzalphenylnitron je Liter. ×— —× Sauerstoffaufnahme unter der Wirkung von 10^{-4} Mol Nitrosobenzol je Liter o— —o Hämiglobinbildung durch 10^{-4} Mol Nitrosobenzol je Liter. - - - - - Sauerstoffaufnahme ohne Zusätze

Außer der Hämiglobinbildung bewirkten Benzylphenylhydroxylamin und Benzalphenylnitron in roten Zellen eine Steigerung des Sauerstoffverbrauchs. In Abb. 5 sind die Hämiglobinbildung und die Sauerstoffaufnahme roter Zellen des Hundes unter der Einwirkung von $2 \cdot 10^{-4}$ Mol Benzylphenylhydroxylamin oder Benzalphenylnitron je Liter wiedergegeben. Die Wirkung der beiden Substanzen war in diesem Versuch innerhalb der kleinen Meßfehler gleich, daher gelten die Kurven

für beide Substanzen. Auch in anderen Versuchen wurden nur sehr geringe Unterschiede in der Stärke der Wirkung der beiden Substanzen gefunden, die innerhalb der Streuung der einzelnen Versuchsergebnisse lagen. Zum Vergleich sind in die Abb. 5 Daten von KIESE u. WALLER über die Wirkung von 10^{-4} Mol Nitrosobenzol je Liter übernommen.

Nach den Daten der Abb. 5 und anderen Versuchen wurde die Geschwindigkeit der Sauerstoffaufnahme durch Benzylphenylhydroxylamin und durch Benzalphenylnitron — in Übereinstimmung mit der Wirkung von Nitrosobenzol und Phenylhydroxylamin — proportional der Geschwindigkeit der Hämiglobinbildung gesteigert. Am Beginn der Reaktion in roten Zellen wurden bei Bildung von 1 Äquivalent Hämiglobin 3—4 Äquivalente Sauerstoff aufgenommen. Bei der Wirkung von $2 \cdot 10^{-4}$ Mol Benzylphenylhydroxylamin oder Benzalphenylnitron je Liter betrug die Anfangsgeschwindigkeit der Reaktion in einer Suspension roter Zellen mit 16 g Hämoglobin je 100 ml $0{,}15 \cdot 10^{-3}$ Äquivalent Sauerstoff $\cdot l^{-1} \cdot min^{-1}$ und $0{,}04 \cdot 10^{-3}$ Äquivalent Hämiglobin $\cdot l^{-1} \cdot min^{-1}$.

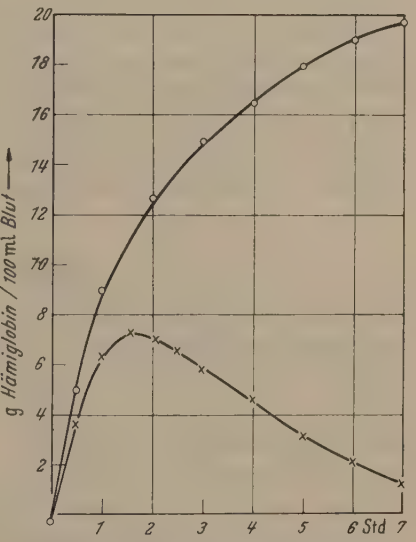


Abb. 6. Änderung der Hämiglobinkonzentration (×—×) und gesamte in der Volumeneinheit Blut gebildete Menge Hämiglobin (c—o) im Blut eines Hundes nach i.v. Injektion von 5,7 mg Benzylphenylhydroxylamin je Kilogramm. Hund 19,5 kg. Gesamtblutfarbstoff 18,5 g/100 ml Blut

4. Hämiglobinbildung in Hunden

Nach intravenöser Injektion bildeten Benzylphenylhydroxylamin und Benzalphenylnitron auch in vivo langsamer Hämiglobin als Phenylhydroxylamin und Nitrosobenzol. Die höchste Hämiglobinkonzentration im Blute wurde 80—100 min nach der Injektion erreicht. In Abb. 6 ist die Hämiglobinkonzentration im Blute eines Hundes nach intravenöser Injektion von 5,7 mg Benzylphenylhydroxylamin je Kilogramm angegeben. Die Hämiglobinkonzentration sank nach dem Erreichen ihres Höchstwertes etwas langsamer ab als nach einer Phenylhydroxylamindosis, welche die Hämiglobinkonzentration auf den gleichen Höchstwert erhöhte.

In Abb. 7 sind die Ergebnisse der Messung der Wirkung verschiedener Dosen von Benzylphenylhydroxylamin und Benzalphenylnitron zusammengestellt. Nach diesen Daten wirkten Benzylphenylhydroxylamin

und Benzalphenylnitron gleich stark, d. h. gleiche Dosen erhöhten die Hämiglobinkonzentration auf den gleichen Wert. Die Dosen sind in Mol/kg angegeben, damit ein Vergleich mit der Wirkung von Phenylhydroxylamin möglich ist. Daten für dessen Wirkungsstärke (nach Messungen von Kiese u. Soetbeer) sind in der Abb. 7 ebenfalls angegeben. In dem untersuchten Bereich der Dosen von 1,9—10,45 mg Benzylphenylhydroxylamin oder Benzalphenylnitron je Kilogramm

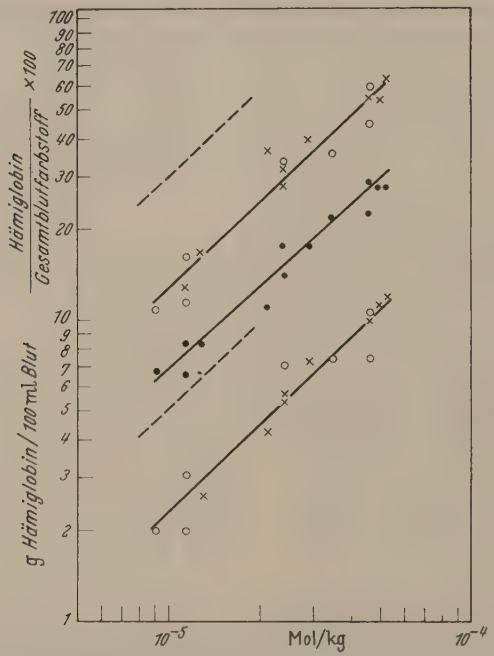


Abb. 7. Erhöhung der Hämiglobinkonzentration im Blute von Hunden und in der Volumeneinheit Blut gebildete Menge Hämiglobin in Abhängigkeit von der i.v. injizierten Dosis Benzylphenylhydroxylamin und Benzalphenylnitron

× Benzylphenylhydroxylamin o Benzalphenylnitron } Hämiglobinkonzentration
--- Daten für Phenylhydroxylamin nach Kiese und Soetbeer
• Durch Benzylphenylhydroxylamin und Benzalphenylnitron gebildete Hämiglobinmenge je Volumeneinheit Blut

bestand zwischen der Stärke der Wirkung und der Dosis die gleiche Beziehung wie beim Phenylhydroxylamin. Jedoch waren Benzylphenylhydroxylamin und Benzalphenylnitron in Hunden nur halb so stark wirksam wie Phenylhydroxylamin.

Wegen der längeren Dauer der Wirkung des Benzylphenylhydroxylamins und Benzalphenylnitrons war die gesamte während der Dauer der Wirkung in der Volumeneinheit Blut gebildete *Menge* Hämiglobin, die infolge der dauernden Reduktion von Hämiglobin nur zum Teil als Hämiglobin*konzentration* in Erscheinung trat, größer als bei der Wirkung

einer Dosis Phenylhydroxylamin, welche die Erhöhung der Hämiglobinkonzentration auf den gleichen Höchstwert bewirkt. Unter Anwendung der Daten von KIESE für die Geschwindigkeit der Reduktion von Hämiglobin im Hunde wurde für die meisten unserer Versuche mit Benzylphenylhydroxylamin und Benzalphenylnitron die während der ganzen Wirkungsdauer in der Volumeneinheit Blut gebildete Menge Hämiglobin berechnet. Die Ergebnisse sind in Abb. 6 u. 7 wiedergegeben. Nach diesen wurde durch Benzylphenylhydroxylamin und Benzalphenylnitron in der Volumeneinheit Blut etwa das Dreifache der von einer Dosis erreichten maximalen Konzentration an Hämiglobin gebildet. Beim Phenylhydroxylamin beträgt die von einer Dosis in der Volumeneinheit Blut gebildete Hämiglobinmenge nur etwa das Doppelte der maximalen Hämiglobinkonzentration (KIESE u. SOETBEER). Daher ist der Unterschied der Wirkungs*größe* (gebildete Hämiglobin*menge* in der Volumeneinheit Blut) zwischen Benzylphenylhydroxylamin und Phenylhydroxylamin geringer als der Unterschied der Wirkungs*stärke* (maximal erreichte Hämiglobin*konzentration*).

Zusammenfassung

Im Benzylphenylhydroxylamin und Benzalphenylnitron wurde ein Paar von Verbindungen gefunden, das wie Phenylhydroxylamin und Nitrosobenzol in roten Blutzellen einen Kreisprozeß der Hämiglobinbildung unterhalten kann.

Die gekoppelte Oxydation des Benzylphenylhydroxylamins und Hämoglobins durch Sauerstoff verläuft etwas langsamer als die entsprechende Reaktion des Phenylhydroxylamins.

Benzalphenylnitron bildet mit Hämoglobin eine Verbindung.

Die Geschwindigkeit des Kreisprozesses der Hämiglobinbildung durch Benzylphenylhydroxylamin und Benzalphenylnitron ist geringer als die des Kreisprozesses Phenylhydroxylamin-Nitrosobenzol; die Anfangsgeschwindigkeiten verhalten sich wie 1:4—1:3.

Im Hunde verläuft die Hämiglobinbildung durch Benzylphenylhydroxylamin und Benzalphenylnitron ebenfalls langsamer als die durch Phenylhydroxylamin und Nitrosobenzol und erreicht Hämiglobinkonzentrationen, die der Wirkung der halben Dosis Phenylhydroxylamin oder Nitrosobenzol entsprechen.

Die Untersuchungen wurden mit Unterstützung der Deutschen Forschungsgemeinschaft durchgeführt.

Literatur

BAMBERGER, E.: Ber. dtsch. chem. Ges. **27**, 1548 (1894).
CUSMANO, G.: Gaz. chim. ital. **51**, II, 306 (1921).
KIESE, M.: Klin. Wschr. **1947**, 453.

Kiese, M., u. D. Reinwein: Naunyn-Schmiedeberg's Arch. exp. Path. Pharmak. **211**, 392 (1950).

Kiese, M., u. I. Reinwein: Naunyn-Schmiedeberg's Arch. exp. Path. Pharmak. **211**, 402 (1950).

Kiese, M., D. Reinwein u. H. D. Waller: Naunyn-Schmiedeberg's Arch. exp. Path. Pharmak. **210**, 393 (1950).

Kiese, M., u. M. Soetbeer: Naunyn-Schmiedeberg's Arch. exp. Path. Pharmak. **207**, 426 (1949).

Kiese, M., u. H. D. Waller: Naunyn-Schmiedeberg's Arch. exp. Path. Pharmak. **211**, 345 (1950).

Utzinger, G. E.: Justus Liebigs Ann. Chem. **556**, 50 (1944).

Prof. Dr. Manfred Kiese, Pharmakologisches Institut d. Univ. Tübingen/Neckar, Wilhelmstraße 56

Druckfehlerberichtigung

zur Arbeit H. Herken, D. Maibauer und D. Neubert: Der Einfluß von Äthionin und anderen Lebergiften auf Fermentsysteme der Lebermikrosomen, Bd. 233, Heft 2, S. 139—150 (1958).

Die beiden Sätze in den Zeilen 26—30 auf S. 142 müssen richtig lauten:

„Auch hier sind wieder die schon erwähnten Geschlechtsunterschiede zu beobachten: bei der akuten Äthioninvergiftung trat bei weiblichen Tieren bereits 24 Std nach Beginn der Äthioningaben (3 × 250 mg/kg) eine deutliche Schlafverlängerung auf. Bei Männchen war ein derartiger Effekt nicht zu beobachten."

Arch. exper. Path. u. Pharmakol., Bd. 233, S. 495—498 (1958)

Aus dem Pharmakologischen Institut der Universität Heidelberg
(Direktor: Professor Dr. F. Eichholtz)

Unveränderter O_2-Verbrauch der Skeletmuskulatur nach ATP, Strophanthin und Oxyäthyltheophyllin

Von
M. Bartels, H. Grzemba, E. Schmid und R. Taugner

(Eingegangen am 11. Februar 1958)

Negative Ergebnisse bei Messung des O_2-Verbrauchs am ruhenden, elektrisch gereizten und ischämischen Skeletmuskel des Hundes erscheinen mitteilenswert im Hinblick auf die weiter unten ausführlicher zu besprechenden Untersuchungen von Anders u. Mitarb. mit ATP sowie von Bücherl u. Schwab mit Strophanthin.

Versuchsanordnung

Carotisdruck und O_2-Sättigung des arteriellen und (aus dem Gastrocnemius fließenden) venösen Blutes wurden an Hunden von 18—25 kg in Urethan-Chloralose-Narkose aufgezeichnet. Die Präparation erfolgte nach den Angaben von Kramer u. Quensel. Hinter dem Oxymeter mit 2 Photoelementen in Kompensationsschaltung (Wever) war in die Femoralvene ein Bubbleflowmeter eigener Fertigung eingeschaltet (Braun u. Mitarb.). In einigen Fällen wurde der vollständig isolierte Gastrocnemius mit Dale-Schuster-Pumpen durchströmt und das Blut im Hooker-Oxygenator arterialisiert. Gefäßspasmen und Ödeme zwangen, diese Anordnung zu verlassen. Der Gastrocnemius wurde nach Unterbrechung der zentripetalen Nervenleitung über Platinelektroden indirekt mit Rechteckstromstößen gereizt. Aufzeichnung der Muskelkontraktionen mittes halbisometrischer Hebel über den abgesägten Calcaneus. Kontrolle der Gastrocnemiustemperatur mit sondenförmigem Thermoelement und Thermorapidgerät. Körperwarme Injektionen in die Art. femoralis dicht oberhalb der Gastrocnemius-Äste. Injektionszeit 1—5 min, Lösungsvolumen im allgemeinen 1 ml. Kontrollinjektionen mit Kochsalzlösung waren ohne Effekt. Zur Gerinnungsverhütung diente Thrombocid.

Versuchsergebnisse

Am ruhenden Muskel wurden nur ATP und Oxyäthyltheophyllin (OT)[1] geprüft. Die Ruhedurchblutung lag bei Versuchsbeginn zwischen 7 und 18 ml/min, nahm aber im Laufe von 1—2 Std um rund 50% ab. Der O_2-Verbrauch, aus arteriovenöser O_2-Differenz und Durchblutungsgröße errechnet, betrug 0,26—0,7 ml/min (vgl. Quensel u. Kramer); die niedrigen Werte kamen regelmäßig bei geringer Ruhedurchblutung vor. Bei allen Durchblutungszunahmen nach Injektion gefäßwirksamer Dosen von ATP und OT war für die Dauer der Durchblutungssteigerung — wahrscheinlich als Ausdruck stärkerer Capillarisierung — eine deutliche Zunahme des O_2-Verbrauchs zu erkennen. Diese Veränderungen des O_2-Verbrauchs waren

[1] Der Fa. Homburg-AG., Frankfurt, verdanken wir die Überlassung des Präparates Cordalin (EW), das neben OT auch noch 20% Theophyllin enthält.

jedoch prozentual deutlich geringer als die Durchblutungsschwankungen, so daß gleichsinnige Veränderungen der venösen O_2-Sättigung und umgekehrte Variationen der O_2-Utilisation auftraten. Der O_2-Verbrauch fiel nach derartigen Durchblutungssteigerungen nicht deutlich unter den Ausgangswert ab. Mit der verwendeten Methodik war allerdings nicht zu entscheiden, ob sekundär vielleicht doch eine geringgradige Abnahme oxydativer oder überhaupt eine Schwankung anoxydativer Stoffwechselprozesse erfolgte (vgl. die Erfahrungen von Quensel u. Kramer mit Acetylcholin).

Die intraarterielle Injektion gefäßerweiternder Dosen von ATP und OT führte diesen Ausführungen zufolge am *ruhenden Muskel* mit der Durchblutungssteigerung auch zum Anstieg des O_2-Verbrauchs und der venösen O_2-Sättigung bei verminderter Utilisation. Gefäßunwirksame Dosen von weniger als 0,001 μg ATP und 5 mg OT veränderten dagegen O_2-Verbrauch, venöse O_2-Sättigung und Utilisation nicht deutlich.

Bei indirekter Reizung (Impulsdauer 10 msec, Reizfrequenz 1—4 sec) stellten sich Muskelleistung, Durchblutung und O_2-Verbrauch innerhalb von 5—10 min auf konstante Werte ein. Die Durchblutung nahm während dieser Zeit um das 3—6fache, der O_2-Verbrauch um das 5—8fache zu.

Bei *elektrischer Reizung* stieg die Durchblutung in einzelnen Versuchen selbst nach intraarterieller Injektion von 100 μg ATP oder 10 mg OT nicht an. In solchen Fällen änderte sich auch der O_2-Verbauch nicht. Der O_2-Verbrauch nahm jedoch zu, wenn ATP oder OT über die Arbeitshyperämie hinaus noch eine weitere Durchblutungssteigerung erzeugten (vgl. Quensel u. Kramer). Die Muskelleistung wurde durch ATP und OT nicht verändert. 10—250 μg K-Strophanthin beeinflußten im allgemeinen Leistung, Durchblutung und O_2-Verbrauch des elektrisch gereizten Muskels nicht (4 Versuche). Zur Vasoconstriction kam es nur in einem Fall, und zwar nach intraarterieller Injektion von 250 μg K-Strophanthin; die gleichzeitige Verminderung des Sauerstoffverbrauchs war offensichtlich durch die mit der Gefäßverengerung einhergehende Einschränkung der Capillarisierung bedingt.

In einer besonderen Versuchsreihe wurde der Gastrocnemius nur alle 5—8 min für je 1 min elektrisch gereizt. Die Reizfrequenz betrug dabei 2—5 sec, die Impulsdauer 0,7 msec. Die intraarterielle Injektion von 20 μg ATP, 100 mg OT bzw. 50 μg K-Strophanthin veränderte auch in dieser Versuchsanordnung den O_2-Verbrauch, beurteilt nach dem Integral der jeweiligen Durchblutungs- und Sättigungskurven, nicht deutlich (insgesamt 8 Injektionen). Lediglich in einem Fall, wo Strophanthin die Arbeitshyperämie etwas einschränkte, war auch der O_2-Verbrauch geringgradig vermindert. Nach ATP kam es umgekehrt einige Male zu zusätzlichen Durchblutungszunahmen mit den oben schon beschriebenen unspezifischen Steigerungen des O_2-Verbrauchs.

ATP (0,05—200 μg, 4 Versuche) und K-Strophanthin (50—100 μg, 3 Versuche) wurden auch am ischämischen Muskel, zum Teil bei elektrischer Reizung, geprüft. Die intraarterielle Injektion erfolgte dabei in Ausnahmefällen nach Abklemmung der Femoralarterie für 15 min. Meist wurden ATP und K-Strophanthin aber distal von der noch liegenden Drosselung appliziert; die Kollateraldurchblutung, bei elektrischer Reizung unter Umständen noch 50% des Kontrollwertes, genügte bei

Verwendung ausreichender Lösungsvolumina zum Abtransport des Injektionsmaterials. In einem Strophanthinversuch wurde die arterielle Drosselung — ähnlich wie von Del Pozo u. Mitarb. bei der Katze — mit intermittierender elektrischer Reizung kombiniert: 1 min Reizung alternierend mit 1 min Pause, dazu Abklemmung der Femoralarterie für je 2 min und Freigabe der Arterie für je 4 min, Strophanthin-Injektion in der Pause zwischen 3. und 4. Drosselung.

Die reduzierte Leistung des *ischämischen Muskels* wurde durch die intraarterielle Injektion von ATP und K-Strophanthin nicht verbessert; auch der O_2-Verbrauch änderte sich nach Injektion dieser Pharmaka bei Arteriendrosselung nicht. Die postischämische Erholungsphase des Muskels wurde durch ATP und Strophanthin nicht verkürzt.

Zusammenfassende Diskussion

Bei der Auswertung von Oxymeter- und Durchströmungskurven am venösen Gastrocnemiusblut sind bestimmte, einschränkende Kriterien zu beachten (Quensel u. Kramer). Für unsere pharmakologische Fragestellung kommt noch hinzu, daß die verwendeten Substanzen gefäßaktiv sind und den O_2-Verbrauch bei höherer Dosierung durch Veränderung der Capillarisierung auch „unspezifisch" modifizieren können. Ohne zeitraubende Vergleichsversuche ist die Wirkung dieser Pharmaka auf den O_2-Verbrauch daher nur bei konstanter Durchblutung einwandfrei zu beurteilen. Bei unveränderter Durchblutung führte die intraarterielle Injektion von 0,001 μg ATP und 5 mg OT am ruhenden und 100 μg ATP, 10 mg OT und 250 μg K-Strophanthin am elektrisch gereizten Gastrocnemius anhand der Beobachtungszeit von 15—30 min aber nicht zu deutlichen Änderungen des O_2-Verbrauchs.

Anders u. Mitarb. hatten nach i.v. Injektion von ATP eine Verbesserung der Muskelleistung am ischämischen „Masseterpräparat" der Ratte beobachtet. Durchblutung und O_2-Verbrauch der Muskulatur wurden dabei nicht gemessen. Neben der vermuteten Stoffwechselwirkung kam daher vor allem eine Erweiterung von Kollateralen als Ursache des ATP-Effektes in Frage. Der oxydative Muskelstoffwechsel wird nach den vorliegenden Ergebnissen im akuten Versuch aber nicht durch ATP beeinflußt. Da am ischämischen Gastrocnemius des Hundes auch die Muskelleistung nicht auf ATP ansprach, könnte man an Speciesunterschiede denken oder annehmen, daß am weniger übersichtlichen Masseterpräparat besondere Versuchsbedingungen mit der Möglichkeit gesteigerter Kollateraldurchblutung vorliegen.

Bücherl u. Schwab fanden am ruhenden Gastrocnemius des Hundes eine Abnahme des O_2-Verbrauchs nach Strophanthin-Injektion. Da gleichzeitig eine Kontraktion der Muskelgefäße auftrat, kam auch verminderte Capillarisierung als unspezifische Ursache dieser „sauerstoffsparenden" Wirkung von Strophanthin in Frage. Im tätigen Organ setzen sich schwächere vasokonstriktorische Einflüsse dagegen oft nicht durch. Die diskutierte Stoffwechselwirkung von Strophanthin konnte daher am elektrisch gereizten Muskel ohne gleichzeitige Durchblutungsschwankung nachgeprüft werden. Das Ergebnis derartiger Versuche war jedoch, selbst am ischämischen Muskel, negativ. Man ist versucht, diese Ergebnisse zur Aufklärung der Herzwirkung von Strophanthin heranzuziehen. Der Skeletmuskel bietet nämlich den Vorteil, einzelne Versuchsbedingungen willkürlich stabilisieren

und so Stoffwechselwirkungen unter konstanten Arbeitsbedingungen messen zu können; herzwirksame Pharmaka beeinflussen den kardialen O_2-Verbrauch dagegen unter Umständen auch indirekt, etwa durch Veränderung der Herzfrequenz oder des Dehnungsgrades. Lendle hat aber die Frage aufgeworfen, ob Herzglykoside den Nutzeffekt des Herzens hauptsächlich über echte sauerstoffsparende Effekte oder durch Veränderung der Arbeitsbedingungen verbessern. Unsere negativen Ergebnisse am Skeletmuskel, dessen Arbeitsbedingungen willkürlich stabilisiert sind, scheinen — unter den angegebenen Vorbehalten — für die letztere Möglichkeit zu sprechen. In diesem Zusammenhang muß jedoch berücksichtigt werden, daß die Herzinsuffizienz am Skeletmuskel nicht zuverlässig imitiert werden kann und z. B. die Kontraktionshöhe des ischämischen Muskels in unseren Versuchen am Hund — im Gegensatz zu den Beobachtungen von Del Pozo u. Mitarb. an der Katze — durch Strophanthin nicht verbessert wurde. Es kommt hinzu, daß der oxydative Stoffwechsel des Skeletmuskels in vitro im Gegensatz zum Herzmuskel nicht auf Strophanthin zu reagieren scheint (Wollenberger; vergl. hierzu auch Calvert u. Huston).

Literatur

Anders, M., W. Nieschke, H. Dahm u. R. Taugner: Naunyn-Schmiedeberg's Arch. exp. Path. Pharmak. **217**, 406 (1953).

Braun, W., K. H. Althoff u. R. Taugner: Naunyn-Schmiedeberg's Arch. exp. Path. Pharmak. **222**, 529 (1954).

Bücherl, E., u. M. Schwab: Klin. Wschr. **1952**, 52.

Calvert, D. N. u. M. J. Huston: Arch. internat. Pharmacodyn. **113**, 45 (1957).

Kramer, K., u. W. Quensel: Pflügers Arch. ges. Physiol. **239**, 620 (1938).

Lendle, L.: Z. Kreisl.-Forsch. **39**, 193 (1949). — Verh. dtsch. Ges. Kreisl.-Forsch. **16**, 54 (1950). — Neue med. Welt **3**, 1 (1950).

Pardo, E. G., D. Garcia-Tellez and E. C. Del Pozo: J. Pharmacol. exp. Ther. **101**, 63 (1951).

Del Pozo, E. C., and E. G. Pardo: J. Pharmacol. exp. Ther. **97**, 144 (1949).

Quensel, W., u. K. Kramer: Pflügers Arch. ges. Physiol. **241**, 698 (1939).

Wever, R.: Pflügers Arch. ges. Physiol. **259**, 97 (1954).

Wollenberger, A.: Pharmacol. Rev. **1**, 311 (1949).

Priv.-Doz. Dr. R. Taugner, Pharmakologisches Institut
der Universität Heidelberg, Hauptstr. 47/51

Arch. exper. Path. u. Pharmakol., Bd. 233, S. 499—505 (1958)

Aus der Inneren Abteilung des Kreiskrankenhauses Heidenheim/Brenz
(Chefarzt: Dr. F. Pendl)

Zur quantitativen photometrischen Bestimmung der freien Adeninnucleotide im menschlichen Blut*

Von
Gerhard Vogel

Mit 2 Textabbildungen

(Eingegangen am 10. Februar 1958)

Mit Hilfe der Chromatographie, der Elektrophorese[4,10,14,16,20,27,39,41] und der enzymatischen Methoden[2,7,22,37,38] ist es möglich geworden, die einzelnen Komponenten des Adenylsäuresystems zu bestimmen. Bei der Durchführung sind zum Teil größere technische Schwierigkeiten zu überwinden. So setzen die enzymatischen Methoden standardisierte Fermente und Zwischensubstanzen voraus, deren Haltbarkeit, insbesondere in wäßriger Lösung gering ist und die erst in den letzten Jahren einem größeren Untersucherkreis zugänglich wurden[5]. Zur quantitativen säulenchromatographischen Bestimmung müssen relativ große Mengen an Organen aufgearbeitet werden. Die Papierchromatographie, die nur geringe Mengen benötigt und eine ausgezeichnete Trennung gestattet, erforderte jedoch für quantitative Messungen in der Regel ein zweistufiges Verfahren, nämlich Lokalisation der Substanzen auf dem Chromatogramm mit dem Photoprintverfahren[28] und Eluieren der Substanzen mit nachfolgender, meist colorimetrischer Bestimmung.

Unseren Untersuchungen lag der Gedanke zugrunde, die für Nucleotide spezifische Extinktion bei 260 mμ nach papierchromatographischer Trennung zur Messung der Substanzmenge direkt auf dem Chromatogrammstreifen auszunutzen. Wir führten unsere Untersuchungen mittels des Spektralphotometers der Firma Zeiss und des zugehörigen Chromatogrammzusatzgerätes durch**.

Methodik

5 cm³ venöses Blut wurden gleich nach der Entnahme in 5 cm³ eiskalte, 10%ige Trichloressigsäure eingespritzt. Der Ansatz wurde sofort kräftig umgeschüttelt und unter wiederholtem Schütteln 1 Std bei Eisschranktemperatur belassen. Danach

* Die Arbeit wurde mit Unterstützung durch die Deutsche Forschungsgemeinschaft durchgeführt, wofür wir unseren aufrichtigen Dank abstatten.

** Für die Möglichkeit, mit den Geräten zu arbeiten und die vielfältigen Ratschläge sind wir der Firma C. Zeiss, Oberkochen, insbesondere den Herren Dr. Höfert und Dr. Müller-Gerbes, sehr zu Dank verpflichtet.

wurden die Ansätze 10 min lang bei 3000 Umdr./min abzentrifugiert und der Überstand zur Untersuchung verwendet. Das Chromatogrammpapier (Schl. & Sch. 2045b Gl) war zuvor mit Lösungsmittel, das wie die spätere Chromatogrammflüssigkeit zusammengesetzt war, gewaschen worden. Da die Konzentration der Adenylsäuren im Blut geringer ist als im Gewebe, andererseits für quantitative Untersuchungen bestimmte Mindestmengen erforderlich waren, erwiesen sich die üblicherweise aufgetragenen Mengen von 0,05 bzw. 0,1 cm³ als zu gering. Um auch beim Auftragen größerer Mengen den Durchmesser des Startflecks klein zu halten, wurde vor dem Aufbringen des folgenden Tropfens der Extrakt mittels zweier, auf die Ober- und Unterseite des Papiers gerichteter Kaltluftgebläse angetrocknet. Für die sukzessive Auftragung haben wir ein automatisches Gerät konstruiert und bauen lassen, das eine Fortentwicklung eines handbetriebenen Gerätes von Kunz[24] darstellt und im folgenden kurz beschrieben sei.

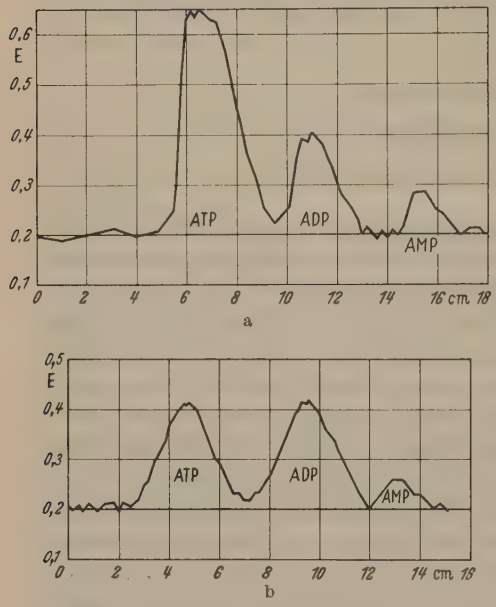


Abb. 1. a Kurvenzug bei Normalfall. Vers. Nr. 30/3, b Kurvenzug eines stark pathologischen Falles (Hyperthyreose). Vers. Nr. 134/2

Auf einem Chromatogrammbogen (18 cm breit, 45 cm lang) wurden jeweils 3 Untersuchungen vorgenommen. Die umgebogenen Spitzen dreier waagrecht liegender 1 cm³-Meßpipetten berührten das ebenfalls waagrecht liegende Papier. Über ein Stück Gummischlauch war an die Pipetten jeweils eine 1 cm³-Rekordspritze angeschlossen. Ein langsamer Vortrieb des Spritzenstempels mußte also den in der Pipette aufgezogenen Trichloressigsäureextrakt herausdrücken und die Auftragung auf das Papier bewerkstelligen. Die Geschwindigkeit des Vortriebs des Spritzenstempels richtete sich nach der Antrocknung des Trichloressigsäureextraktes auf dem Papier mittels der Kaltluftgebläse. Ein kleiner Gleichstrommotor mit Widerstandsregelung und ein mehrfaches Schneckengetriebe bewerkstelligten eine kontinuierliche Auftragung von 0,5 cm³ des Trichloressigsäureextraktes auf saubere Startflecke von weniger als 1 cm Durchmesser.

Für die Chromatographie wurde folgendes Lösungsmittel nach Schmid u. Kunz[36] verwendet: 20 T. Isobutanol, 20 T. Isopropanol, 40 T. Aceton und 60 T. 30%ige Ameisensäure. Die Chromatographie erfolgte aufsteigend bei möglichst konstanter Temperatur über 24 Std. Nach völligem Trocknen des Papiers wurde nochmals im gleichen Lösungsmittel chromatographiert. Die Chromatogramme wurden nach dem Trocknen in 3,5 cm breite Längsstreifen geschnitten, aufgerollt und mit Paraffinum liquidum pro injectione „Merck" getränkt. Dies erwies sich als genügend frei von UV-absorbierenden Substanzen.

Die quantitative Bestimmung der Substanzen wurde mit dem Spektralphotometer PMQ II Zeiss bei einer Wellenlänge von 260 mμ, einer Spalthöhe von 6 mm und einer Spaltbreite von 1 mm vorgenommen. Die einzelnen Meßpunkte längs des

Papiers lagen in einem Abstand von 2 mm. Damit war auch die in einer Konzentration von 1—6 mg-% vorliegende AMP noch gut nachweisbar.

Messungen an nur mit Lösungsmittel ohne Substanz chromatographiertem und mit Paraffin getränktem Papier ergaben eine gewisse „Wolkigkeit" des Papiers. Diese ist jedoch relativ gering, so daß sie auf die Messung der mengenmäßig überwiegenden und hauptsächlich interessierenden ATP und ADP keinen Einfluß mehr hat. Durch Vergrößerung der Spalthöhe läßt sich der Einfluß der Wolkigkeit des Papiers noch verringern.

2 Kurven, wie sie nach den Messungen erhalten wurden, sind in Abb. 1 wiedergegeben, wobei Kurve *a* einen Normalfall, Kurve *b* einen pathologischen Fall darstellt.

Der Flächeninhalt, der den einzelnen Substanzen zukam, wurde planimetrisch ermittelt. Zur Eichung setzten wir reine AMP in verschiedenen Mengen den Trichloressigsäureansätzen zu. Die nach Abzug der Extinktion der aus dem Blut stammenden AMP sich ergebenden Planimeterwerte wurden in nachstehende Eichkurve (Abb. 2) eingetragen. Es zeigte sich eine erstaunlich geradlinige Korrelation zwischen zugesetzter Substanz und Planimeterwert. Somit war es möglich, unter Berücksichtigung der Molekulargewichte von ATP (Mol-Gew. 507,21), ADP (Mol-Gew. 427,22) und AMP (Mol-Gew. 347,23) nicht nur die Absolutwerte der einzelnen Substanzen, sondern auch die Summe der 3 Substanzen (Gesamtadenylsäuren) anzugeben.

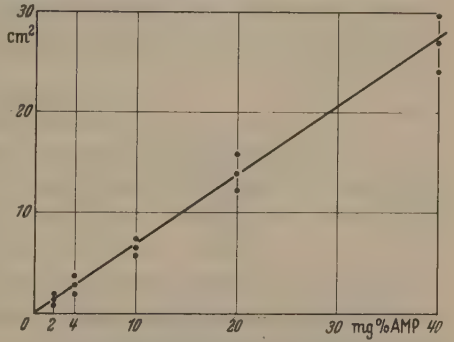


Abb. 2. Eichkurve der Planimeterwerte (jeweils 6 Bestimmungen mit Angabe der σ)

Für spätere Fragestellungen erwies sich das Verhältnis von ATP zu ADP als wesentlich. Die Genauigkeit, mit der nach der angegebenen Methode der ATP/ADP-Quotient bestimmt werden kann, prüften wir in Doppelversuchen nach und errechneten nach Gebelein-Heite[17] eine mittlere Standardabweichung von 8,5%.

Zur Kontrolle führten wir bei jeder papierchromatographischen Untersuchung eine Bestimmung der Gesamtadenylsäuren durch Erfassung der Ribosekomponente nach der Methode von Barrenscheen[3] durch. Da es sich bei den untersuchten Substanzen im wesentlichen um ein Gemisch von ATP, ADP und AMP handelte, erfolgte die Eichung der Orcinreaktion mit jeder Substanz getrennt. Es zeigte sich, daß diese untereinander nicht dem molekularen Gehalt an Ribose entsprachen. Die AMP gibt bei gleicher molarer Konzentration eine etwas höhere Extinktion als die ADP und diese wieder eine höhere als die ATP. Die einzelnen Eichkurven folgten jedoch sehr genau dem Lambert-Beerschen Gesetz.

Neben den Ansätzen für die Papierchromatographie wurde noch eine größere Anzahl von Analysen allein mit der Orcinreaktion durchgeführt. Wie weiter unten gezeigt wird, läßt sich aus einer größeren Anzahl von Untersuchungen auf papierchromatographischem Wege ein durchschnittliches Verhältnis der einzelnen Fraktionen ermitteln. Somit konnten wir aus den Eichkurven der 3 Adenosinphosphorsäuren die Eichwerte der Gesamtadenylsäuren errechnen.

Da mit der Orcinmethode auch das Adenosin und andere Pentosen mitbestimmt werden, andererseits sich auch der Einfluß der in höheren Konzentrationen

bekanntlich störenden Hexosen bemerkbar macht, lagen diese Werte erwartungsgemäß etwas höher als die aus den papierchromatographischen Bestimmungen, weswegen wir die Orcinwerte um den entsprechenden Faktor reduziert haben. Die statistische Durchrechnung bezüglich der Übereinstimmung der beiden Methoden ergab unter der Voraussetzung zweier unabhängiger Bestimmungen den Korrelationskoeffizienten von 0,905 (Methode nach Koller[23]). Unter der Annahme von Doppelbestimmungen betrug die mittlere Standardabweichung 9,3% (Methode nach [17]). Es erschien somit gerechtfertigt, aus den Werten der papierchromatographischen und der Orcinmethode einen Mittelwert zu bilden und auf Grund der papierchromatographischen Verteilung die Werte von ATP, ADP und AMP zu errechnen.

Ergebnisse

Die Werte der vorzugsweise mit der Orcinmethode bestimmten Gesamtadenylsäuren im Blut (ausgedrückt in Milligramm-Prozent) und die auf die Anzahl der Erythrocyten bezogenen Werte (Milligramm-Prozent pro Mill. Erythrocyten im mm^3 = mg/10^{11} Erythrocyten) sind in Tab. 1 niedergelegt.

Tabelle 1

	Anzahl der Messungen	mg-%	σ	$\frac{mg}{10^{11}\ Ery.}$	σ
Männer . .	500	66,8	8,9	14,7	2,1
Frauen . . .	646	60,0	8,6	14,6	2,2

Es zeigt sich, daß die Gesamtadenylsäuren bei Männern deutlich höher als bei Frauen liegen. Der Unterschied läßt sich auch statistisch sichern. Er hat seinen einfachen Grund darin, daß die Adenylsäuren unter normalen Bedingungen nur in den Zellen enthalten sind, Frauen jedoch weniger Erythrocyten im Kubikmillimeter Blut besitzen. Die bei jedem einzelnen Patienten auf die Anzahl der Erythrocyten im Kubikmillimeter bezogenen Werte weisen somit im Mittel keine Unterschiede zwischen Frauen und Männern mehr auf.

Tabelle 2. *Werte für ATP, ADP, AMP (in Milligramm-Prozent) und für den ATP/ADP-Quotienten*

	Anzahl der Messungen	ATP	ADP	AMP	Q	σ
Männer . .	110	45,8	17,5	3,7	2,62	0,62
Frauen . . .	231	40,5	15,6	3,4	2,60	0,64

Tab. 2 gibt die Werte für ATP, ADP und AMP sowie für den ATP/ADP-Quotienten bei Männern und Frauen wieder. Die Einzelfraktionen sind wiederum bei Männern höher als bei Frauen, doch weisen sie keinen Unterschied hinsichtlich ihrer prozentualen Zusammensetzung auf. Nun sind die angegebenen Werte zum kleineren Teil von Gesunden, zum größeren Teil von Patienten mit internen Krankheiten gewonnen, die

zum Teil deutliche Veränderungen im Adenylsäuresystem aufwiesen. Auffällig war, daß niedrigen Gesamtadenylsäuren in den Einzelfällen ein stark erniedrigter ATP/ADP-Quotient entsprach. Die nach Koller[23] durchgeführte korrelationsstatistische Berechnung dieser beiden Größen ließ einen signifikanten Zusammenhang erkennen. Es tritt somit nicht nur eine Verschiebung von ATP zu ADP, etwa im Sinne von Martius[29,30] als Entkoppelung der oxydativen Phosphorylierung auf, sondern es sind in pathologischen Fällen gleichzeitig die Gesamtadenylsäuren erniedrigt. Mit anderen Worten heißt das, daß in diesen Fällen bei gleichbleibender AMP die ADP leicht angestiegen, die ATP jedoch stark abgefallen ist.

Diskussion

In methodisch ähnlichen Untersuchungen[8,12,13] wurde zwar unter anderem auch die Gültigkeit des Lambert-Beerschen Gesetzes für Direktmessungen am Papier festgestellt[31,33], doch traten Störungen durch die Inhomogenität des Papiers auf. Es konnte hier gezeigt werden, daß mittels des beschriebenen Auftragegerätes durch Konzentrierung der zu untersuchenden Substanzen dieser Schwierigkeit begegnet werden kann.

Die Angaben über den Gehalt an ATP im Blut schwanken je nach der verwendeten Methode zwischen 11 und 84 mg-%[4,9,18,21,26,37,38,40]. Die von uns gefundenen Werte liegen in der Mitte dieses Bereichs.

Eine mögliche Fehlerquelle bei der papierchromatographischen Bestimmung liegt darin, daß mit den entsprechenden Adenosinphosphaten auch noch andere Nucleotide, die im Chromatogramm an derselben Stelle liegen, etwa Guanosin-Mono-, Di- und Tri-Phosphat, die jedoch in weit geringerer Menge vorhanden sind, mitbestimmt werden.

Eine Schwierigkeit jeder ATP-Bestimmung liegt in der Möglichkeit, daß in der Zeit von der Blutentnahme bis zur quantitativen Erfassung ein artefizieller Abbau von höher zu niedriger phosphorylierten Stufen auftritt. Das Verhältnis ATP/ADP/AMP kann somit geradezu als Maß der Vermeidung artefizieller Abbauveränderungen dienen. Wohl aus dem genannten Grunde schwanken die in der Literatur angegebenen Werte für das ATP/ADP-Verhältnis außerordentlich, nämlich zwischen 9 : 1 und 1 : 7[1,2,4,11,15,18,25,34,35,40]. Der von uns bei Gesunden gefundene Wert (in molarem Verhältnis ausgedrückt 2,7 : 1) liegt etwas höher als die in letzter Zeit mit enzymatischen Methoden[18] ermittelten.

Gegenüber den kürzlich von Pirwitz u. a.[32] auf Grund einer Diazotierungsmethode gefundenen Werten der Summe von ATP und ADP konnten wir sehr wohl Unterschiede zwischen Männern und Frauen in Abhängigkeit von der Erythrocytenzahl, als auch an einem größeren Untersuchungsmaterial Differenzen zwischen Gesunden und Kranken feststellen, denen auch Unterschiede im Verhältnis der Einzelfraktionen entsprachen.

Zusammenfassung

Es wurde eine Methode beschrieben, die direkt auf Papierchromatogrammen eine quantitative spektralphotometrische Erfassung von ATP, ADP und AMP gestattet. Zur Auftragung größerer Flüssigkeitsmengen auf kleine Startflecke am Chromatogrammpapier wurde ein einfaches, automatisch arbeitendes Auftragegerät entwickelt. Mit der Orcinmethode wurde eine Kontrolle der Gesamtadenylsäurewerte durchgeführt und durch Doppelbestimmungen die Verläßlichkeit der ATP/ADP-Quotienten nachgeprüft. Der höheren Erythrocytenzahl entsprechend, liegen die Gesamtadenylsäuren im Blut bei Männern höher als bei Frauen. Das Verhältnis ATP/ADP/AMP zeigte keinen Unterschied zwischen Männern und Frauen. Arbeiten anderer Autoren mit ähnlichen Methoden und Untersuchungen mit anderen Methoden am Adenylsäuresystem wurden diskutiert und auf die Frage des artefiziellen Abbaus hingewiesen. Mögliche Fehlerquellen wurden besprochen.

Literatur

[1] Adam: Dissertation Marburg 1955.

[2] Albaum, H. G., A. Rottino and G. T. Hoffmann: J. Lab. clin. Med. **42**, 255 (1953).

[3] Barrenscheen, H. K., u. A. Peham: Hoppe-Seylers Z. physiol. Chem. **272**, 81 (1942).

[4] Bartlett, G., E. Savage, L. Hughes and A. Marlow: J. appl. Physiol. **6**, 51 (1953).

[5] Biochemica Boehringer 1955—1957.

[6] Boettge, K., K. H. Jäger u. H. Mittenzwei: Arzneimittel-Forsch. **7**, 24 (1957).

[7] Brody, T., and J. A. Bain: J. biol. Chem. **195**, 685 (1952).

[8] Brown, J. A., and M. M. Marsh: Analyt. Chem. **25**, 1865 (1953).

[9] Cafiero, M., et P. Rosotto: Arch. sci. med. **96**, 443 (1953).

[10] Cohn, W. E., and C. E. Carter: J. Amer. chem. Soc. **72**, 4273 (1950).

[11] Dianzani, M. U.: Biochem. J. **65**, 116 (1957).

[12] Durrum, E. L., and S. R. Gilford: Rev. Sci. Instr. **26**, 51 (1955).

[13] Eger, Ch.: Experientia (Basel) **12**, 37 (1956).

[14] Eggleston, L. V., and R. Hems: Biochem. J. **52**, 156 (1952).

[15] Ennor, A. H., and L. A. Stocken: Biochem. J. **42**, 549 (1948) zit. nach [11].

[16] Fleckenstein, A., u. E. Gerlach: Naunyn-Schmiedeberg's Arch. exp. Path. Pharmak. **219**, 531 (1953).

[17] Gebelein, H., u. H. J. Heite: „Statistische Urteilsbildung". Berlin: Springer 1951.

[18] Hockerts, Th., u. W. Lamprecht: Medizinische **1957**, 289.

[19] Hoppe-Seyler-Thierfelder „Handbuch der physiologisch- und pathologisch-chemischen Analyse. Bd. I/1, 488. Berlin, Göttingen, Heidelberg: Springer 1955.

[20] Hurlbert, R. B., H. Schmitz, A. F. Brumm and R. van Potter: J. biol. Chem. **209**, 23 (1954).

[21] Kerr, S. E., and L. Daoud: J. biol. Chem. **109**, 301 (1935).

[22] Kielley, W. W., and O. Meyerhof: J. biol. Chem. **183**, 391 (1950); zit. nach [6].

[23] Koller, S.: „Graphische Tafeln zur Beurteilung statistischer Zahlen." Darmstadt: Dietrich Steinkopff 1953.

[24] Kunz, W.: Persönliche Mitteilung.

[25] Le Page, G. A.: Amer. J. Physiol. **146**, 267 (1946).
[26] Lohmann, K.: Biochem. Z. **202**, 466 (1928); **203**, 164 (1928).
[27] Magasanik, B., E. Vischer, R. Doniger, D. Elson and E. Chargaff: J. biol. Chem. **186**, 37 (1950).
[28] Markham, R., and J. D. Smith: Biochem. J. **45**, 401 (1951).
[29] Martius, C.: Conférences et Rapports, 3me Congrès Internat. de Biochimie, Bruxelles 1955.
[30] Martius, C.: Klin. Wschr. **1957**, 223.
[31] Paladini, A. C., and L. F. Leloir: Analyt. Chem. **24**, 1024 (1952).
[32] Pirwitz J., E. Haaf u. H. Th. A. Schmitt: Naunyn-Schmiedeberg's Arch. exp. Path. Pharmak. **232**, 387 (1957).
[33] Price, T. D., P. B. Hudson and D. F. Ashman: Nature (London) **175**, 45 (1955).
[34] Rapoport, S.: J. biol. Chem. **161**, 429 (1945).
[35] Rowles, S. L.: Biochem. J. **52**, XXXI (1952).
[36] Schmid, W., u. W. Kunz: Naturforsch. (im Druck).
[37] Sedlmayr, G., u. H. Holzer: Klin. Wschr. **1956**, 133.
[38] Stein-Parve, E. P.: Biochim. biophys. Acta **10**, 121 (1953).
[39] Turba, F., H. Pelzer u. H. Schuster: Hoppe-Seylers Z. physiol. Chem. **296**, 97 (1954).
[40] Weil-Malherbe, H.: J. ment. Sci. **96**, 226 (1950).
[41] Wollenberger, A.: Nature (London) **173**, 205 (1954).

Dr. Gerhard Vogel, Heidenheim/Brenz, Zollernstr. 16

Arch. exper. Path. u. Pharmakol., Bd. 233, S. 506—511 (1958)

Aus dem Pharmakologischen Institut der Universität Kiel
(Direktor: Prof. Dr. B. Behrens)

Ein Federmanometer zur Registrierung des Blutdrucks und der Pulsfrequenz im pharmakologischen Experiment

Von
Lucie Schlosser

Mit 5 Textabbildungen

(Eingegangen am 25. Januar 1958)

Bei vielen pharmakologischen Experimenten pflegt man, um über die Veränderungen der Kreislaufverhältnisse orientierende Angaben zu gewinnen, den Blutdruck fortlaufend auf einer Rußkurve zu registrieren, da man aus dem mittleren Blutdruck, der Pulsfrequenz und der Pulsamplitude schon weitgehende Schlüsse ziehen kann. Hierfür sind verhältnismäßig grobe Methoden ausreichend.

Uns ist nun aufgefallen, daß in den letzten Jahren das alte Ludwigsche Quecksilbermanometer wieder bevorzugt angewandt wird, obwohl die Nachteile dieses Manometers gegenüber den Membran- bzw. Federmanometer schon sehr lange bekannt sind. Hierüber findet sich eine ausgedehnte Literatur, die in einschlägigen Handbüchern nachgelesen werden kann. Das Quecksilbermanometer hat einen praktischen Vorteil, der darin besteht, daß der Blutdruck ohne weiteres in Millimeter registriert wird und die lästigen Eichungen damit wegfallen. Ein weiterer praktischer Vorteil besteht darin, daß die Aufzeichnungen nicht bogenförmig auf der Rußtrommel verlaufen. Die bekannten Nachteile des Quecksilbermanometers sind im wesentlichen durch die großen Massen, die bewegt werden, bedingt, wodurch eine ungünstige Eigenschwingung resultiert. Das Quecksilbermanometer ist sehr träge, und die Amplituden werden mehr oder weniger stark verzerrt. Der Hauptnachteil besteht aber darin, daß bei plötzlichem Blutdruckabfall unter Umständen gefährlich werdende Mengen der — in jedem Fall giftigen — Sperrflüssigkeit in das Tier zurückfließen können und grobe Versuchsfehler hervorrufen. Für kleine Versuchstiere, z. B. Ratten ist aus dem letztgenannten Grund das Quecksilbermanometer kaum anwendbar.

Wir haben uns die Frage vorgelegt, ob die Vorteile des Hg-Manometers nicht auch bei einem Membran- bzw. Federmanometer bei Umgestaltung der üblichen Apparaturen erreicht werden können. Es sollte also ein Manometer konstruiert werden, das nicht nachgeeicht werden muß, und das innerhalb des in Frage kommenden Druckbereiches möglichst linear und möglichst gradlinig registriert.

Eine Reihe von Versuchen ergab, daß ein Federmanometer diesen Anforderungen am besten entspricht, wenn die Feder nicht wie z. B. bei der bekannten Apparatur nach HÜRTHLE an dem Hebel, sondern an dem Stempel, der auf der Membran sitzt, angreift. Die andere Forderung, möglichst gradlinige Registrierung auf dem Kymographion, ließ sich dadurch verwirklichen, daß es gelang, sehr viel längere Hebel als üblich von sehr geringer Masse aber großer Stabilität zu konstruieren. Diese Hebelkonstruktion ist auch für andere Zwecke mit großem Vorteil zu verwenden.

Die modernen Klebstoffe (z. B. „Uhu hart") gestatten, dünnste trockene Grashalme so miteinander zu verbinden, daß — wie dieses bei

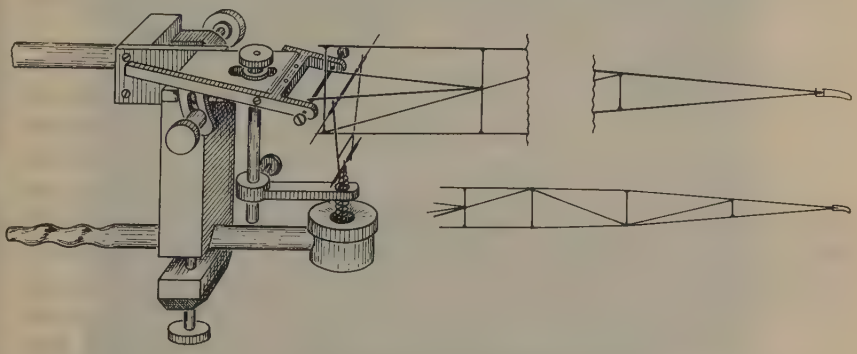


Abb. 1. Federmanometer. Übersicht. Maßstab etwa 1:2,5

Eisenkonstruktionen bekannt ist (Gittermasten) — Hebel konstruiert werden können, die eine geringe Elastizität aufweisen und selbst bei größeren Längen noch eine verhältnismäßig geringe Masse darstellen. Es ist so möglich, Hebel zu konstruieren, die bei einer Länge von 30 cm nur ein Gewicht von etwa 3 mg pro Zentimeter haben.

Da es darauf ankam, auch die bewegliche Masse der übrigen Apparatur klein zu halten, wurden die nötigen Gelenkverbindungen ebenfalls aus Grashalmen hergestellt, wobei als Achse ein dünner Stahldraht dient (z. B. die als Mandrin bei Kanülen benutzten Drähte). Die Einzelheiten sind aus der Abb. 1 zu erkennen. Wie oben schon erwähnt, wurden die Federn an dem Stempel (4,0 mm ⌀), der auf einer nicht gespannten dünnen Gummimembran (Doppellage Condomgummi bzw. dünner Kinderluftballon) sitzt, angebracht. Nach einer Reihe von Versuchen haben sich zwei gegeneinander leicht gespannte kegelförmige Spiralfedern als am zweckmäßigsten erwiesen. Durch diese Anordnung wird der Stempel mit seiner Achse gleichzeitig in seiner senkrechten Lage zur Membran ohne störende Reibung genügend fixiert. Die Federn wurden von uns selbst auf einfachste Weise hergestellt: geeigneter Draht (0,4 mm ⌀) wurde über einen passenden kegelförmigen Kern — es genügt

eine Bleistiftspitze — gewickelt. Die Federn hatten 5—6 Windungen. Die Basen der Kegelfedern (etwa 5 mm ⌀) wurden auf die in der Abbildung zu sehende durchbohrte Metallschiene gelötet und die Kegelspitzen ebenfalls durch Löten befestigt, die untere auf dem Stempel, die obere an der Stempelachse (Messingstange 0,7 mm ⌀), wobei auf eine geringe Spannung der Federn gegeneinander Wert gelegt wurde (Abb. 1 u. 2).

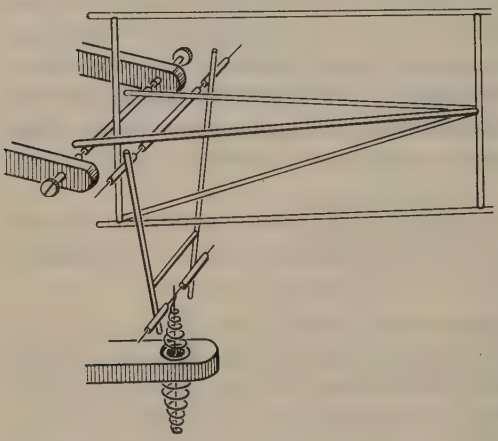


Abb. 2. Federn und Hebelachsen

Die Registrierkapsel (Abb. 3), ist in der üblichen Weise konstruiert. Eine ausgestanzte Gummischeibe wird ohne Spannung auf den Innenrand der Druckkammer gelegt. Hierauf kommt ein Metallring, der durch 2 kleine Stifte von geringerer Länge als der Dicke dieses Ringes vor Verschiebungen gesichert ist. Durch eine Überwurfschraube wird mit der Hand die nötige Abdichtung hergestellt. Die Kammer ist nach außen mit zwei rechtwinklig zueinander angesetzten Rohren von 4 mm Innendurchmesser verbunden. Das eine Rohr dient zur luftblasenfreien Füllung der Kammer mit Sperrflüssigkeit. Verschlossen wird dasselbe durch einen kurzen Schlauch mit Schlauchklemme. Metall- und Glashähne haben sich nicht bewährt. Die rechtwinklige Anordnung der beiden Rohre haben wir gewählt, weil auf diese Weise ein Rohr zur verschieblichen Befestigung am Halteblock dienen kann und trotzdem die Verbindung zum Tier sowohl rechts als links von der Apparatur möglich ist. Bei einer anderen Anordnung, mit einer gesonderten Befestigungsstange, stört das unbenutzte Rohrende häufig.

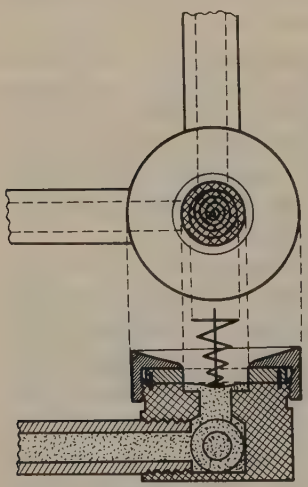


Abb. 3. Registrierkapsel. Aufsicht und Querschnitt. Maßstab 1:1

Die Hebellänge beträgt 25—30 cm, der Angriffspunkt des Hebels liegt ungefähr 0,5 cm von der Achse. Das Verbindungsstück zwischen Federn und Hebel darf nicht zu kurz sein (3 cm), damit sich bei höheren Drucken die Angriffswinkel und damit die Kraft, die auf den Hebel wirkt,

nicht merklich vermindern. Der nichtlineare Druckanstieg bei den sonst üblichen Manometern ist sicher zum Teil darauf zurückzuführen, daß dies nicht berücksichtigt wurde.

Wie weit die geforderten Bedingungen erfüllt sind, zeigt die Kurve und Eichkurve (Abb. 4). Wir haben uns davon überzeugt, daß eine einmal ausgeführte Eichung, auch bei Nichtbenutzung des Apparates,

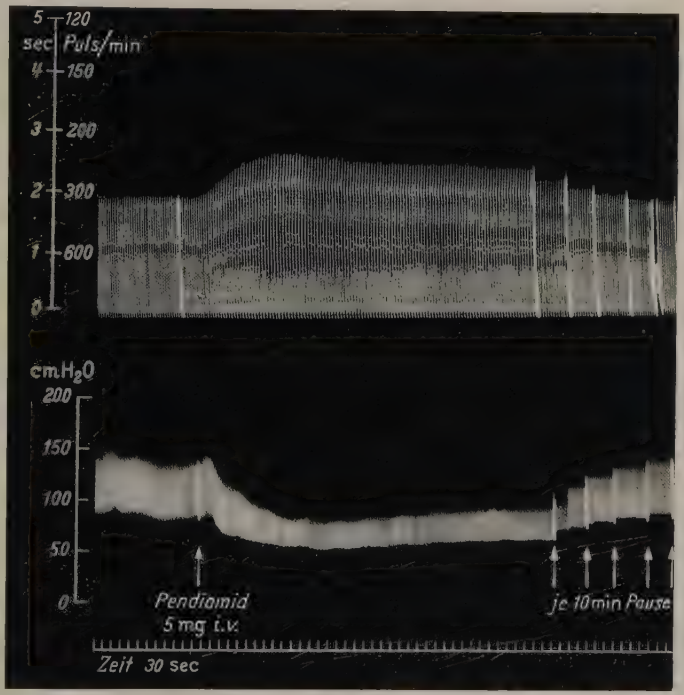


Abb. 4. Katze, Urethannarkose, Vagi durchschnitten, 5 mg Pendiomid i.v. Obere Kurve: Pulsfrequenz unter Verwendung eines Zählwerks und Ordinatenschreibers (modifiziert nach Lullies). Die Höhe ergibt die Zeitdauer von 10 Pulsen in Sekunden. Untere Kurve: Blutdruck

wie zu erwarten, praktisch konstant bleibt. Die Eigenspannung der Membran ist innerhalb der in Frage kommenden Druckänderung völlig zu vernachlässigen. Die Eigenfrequenz des Systems ist naturgemäß von den Federn und auch von der Länge des benutzten Hebels abhängig. Sie liegt zwischen 10 u. 20 Hertz. Das ungedämpfte System zeigte ein Dämpfungsdekrement von 5 : 1. Beim Schreiben höherer Frequenzen ist eine zusätzliche Dämpfung erforderlich, die wir einfach dadurch erreichen, daß an dem Verbindungsstück zu dem zum Tier führenden Bleirohr ein Schraubenquetschhahn angebracht ist.

Registrierung der Pulsfrequenz

Das im vorhergehenden beschriebene Instrument zur Registrierung des Blutdrucks kann auch zur Registrierung der Pulsfrequenz benutzt werden (s. Abb. 4). Für manche Versuche ist die Registrierung von Frequenz und Druck sehr erwünscht. Mit diesem Problem haben sich vor allem GENUIT und GENUIT u. RUPPERT eingehender beschäftigt, die bei Anwendung eines Quecksilbermanometers ein verhältnismäßig einfaches Verfahren angegeben hatten. Da der mittlere Blutdruck, der die Basis der positiven und negativen Pulsschwankungen darstellt, laufenden Schwankungen unterworfen ist, muß das registrierende Element diesem zwanglos folgen. Hieraus ergeben sich einige prinzipielle Forderungen, wenn, wie meist üblich, die Registrierung durch den einfachen Schluß eines Kontaktes erfolgen soll. Der registrierende Teil muß so leicht verschieblich sein, daß durch ihn die Blutdruckamplituden nicht merklich gedämpft werden. Auch darf dieser hierbei nicht in Schwingungen geraten. Dies ist nur zu erreichen, wenn die bewegliche Masse sehr gering ist, damit die Bewegung möglichst regulierbar, gerade so gebremst werden kann, daß ein noch ausreichender Widerstand vorhanden ist, um einen sicheren Kontaktschluß zu ermöglichen. Es wird aus diesem Grund auch die Verwendung eines empfindlichen Relais erforderlich.

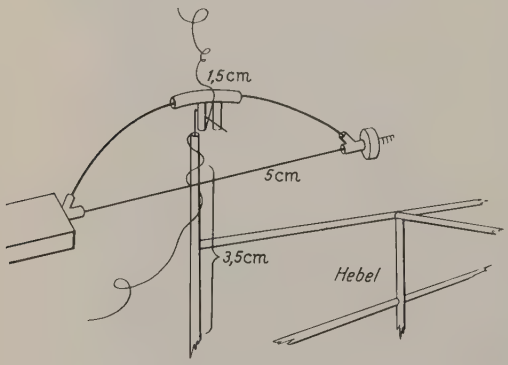


Abb. 5. Kontaktgeber für Pulsfrequenzzähler

Am zweckmäßigsten haben wir die folgende Anordnung gefunden: Senkrecht zum Schreibhebel wird über dem Drehpunkt ein 3,5 cm langer Grashalm geklebt, der rechtwinklig an seiner Spitze starren Platindraht trägt von etwa 0,5 cm Länge. Dieser Draht greift in einen Schieber. Dieser besteht aus einem gebogenen Halmstück[1] von etwa 1,5 cm Länge, an dessen konkaver Seite 2 kleine Halmstücke im Abstand von 1 mm angeklebt sind. Zwischen beiden ist schräg ein Platindraht angebracht. Dieser Platindraht und der Platindraht am Hebel sind mit

[1] Grashalme lassen sich leicht in die gewünschte Form biegen, wenn man sie stark erwärmt; etwa bis zu der Temperatur, bei der sie sich zu bräunen beginnen. Die nötige gleichmäßige Erwärmung kann man durch Bestreichen mit einem Lötkolben oder einer glimmenden Zigarette bei einiger Übung erreichen. Hat man ein Stück, dessen Biegung dem Drahtbügel ungefähr entspricht, so wird es über denselben gezogen. Durch weiteres Erwärmen paßt es sich dann der Biegung des Drahtes auf das Genaueste an.

dünnstem lackiertem Kupferdraht mit einem Relais verbunden. Der Schieber gleitet auf einem sehr sauber gebogenem Drahtbügel von 3,7 cm Radius, der, wie aus der Abbildung zu ersehen, so befestigt ist, daß der Mittelpunkt des Bogens mit der Achse des Hebels übereinstimmt. Der Bügel kann durch eine Schraube am Ende oder auf andere Art leicht gespannt werden, um gegebenenfalls die Reibung des Schiebers auf dem Gleitdraht zu verändern (Abb. 5).

Bei jeder Pulswelle schiebt der Hebel den Schieber nach hinten und gibt Kontakt, um ihn bei Abebben der Pulswelle unter Öffnen des Kontaktes wieder nach der Gegenseite zu bewegen. Durch geringes Verbiegen des Platindrahtes am Ende des Hebels in vertikaler Richtung kann der nötige Spielraum reguliert werden, damit beim Zurückgehen des Hebels der Kontakt sich öffnet.

Durch diesen Kontakt wird ein Relais gesteuert. Ein gewöhnliches elektronisches Relais ist ausreichend. Da bei schnellen Pulsen die Schlußzeit des Kontaktes sehr kurz sein kann, ist eine relativ hohe Stromstärke und Spannung zweckmäßig, um einen Ordinatenschreiber oder ein Zählwerk störungssicher zu betreiben. Deshalb schalten wir meistens noch ein mechanisches Relais zwischen das Elektronenrelais und die Registriereinrichtung. Vorteilhaft ist die Verwendung eines Relais wie es von Genuit angegeben wurde.

Zusammenfassung

Es wird ein Federmanometer beschrieben, das durch besondere Anordnung der Federn bei ungespannter Membran und durch einen langen Hebel aus Grasstroh den Blutdruck linear und geradlinig registriert.

Durch einen Platinkontakt am senkrecht verlängerten Hebel und an einem verschieblichen Schieber auf einem gebogenen Draht kann das Manometer gleichzeitig zur Registrierung der Pulsfrequenz dienen. Der bei jeder Pulswelle erfolgte Kontakt kann zum Betreiben eines Zählwerkes oder eines Ordinatenschreibers benutzt werden.

Literatur

Genuit, H.: Registrierung der Herzfrequenz mit Hilfe der Blutdruckamplitude. Naunyn-Schmiedeberg's Arch. exp. Path. Pharmak. **221**, 1 (1954).

Genuit, H., u. H. Ruppert: Einige Verbesserungen an üblichen Registrier- und Reizmethoden. Naunyn-Schmiedeberg's Arch. exp. Path. Pharmak. **200**, 684 (1942/43).

Lullies, H.: Ein Zeitordinatenschreiber auf elektrischer Grundlage. Pflügers Arch. ges. Physiol. **241**, 354 (1938/39).

Dr. Lucie Schlosser,
Pharmakologisches Institut der Universität Kiel, Hospitalstr. 20

Arch. exper. Path. u. Pharmakol., Bd. 233, S. 512—517 (1958)

Aus dem Pharmakologischen Institut der Universität Würzburg
(Vorstand: Prof. Dr. phil. et Dr. med. W. Neumann)

Toxikologische Untersuchungen über Triphenylphosphat, Trixylenylphosphate und Triarylphosphate aus Mischungen homologer Phenole

Von
Dietrich Henschler und Hans-Helmut Bayer

(Eingegangen am 14. März 1958)

Triarylphosphate werden in der Technik vor allem als Lack- und Schmiermittelzusätze in großen Mengen verwendet. Technische Trikresylphophate enthielten früher rund 30% Orthokresol im phenolischen Anteil. Inzwischen sind sogenannte „orthoarme", manchmal auch als „orthofrei" bezeichnete Präparate hergestellt worden, in denen der Orthokresolgehalt im Rahmen des technisch Möglichen auf 2—3% des Gesamtkresols herabgesetzt ist.

Die neurotoxische Wirksamkeit technischer Trikresylphosphate beruht *nicht*, wie man lange Zeit angenommen hat, auf ihrem Gehalt an *Tri-ortho*kresylphosphat. Sie wird vielmehr, wie wir zeigen konnten, vom Gehalt an orthokresylhaltigen Mischestern bestimmt, unter denen die mit nur einer Orthokresylgruppe die vergleichsweise höchste Toxicität aufweisen. Da in orthoarmen Trikresylphosphaten das Orthokresol vorwiegend in Form dieser Monoorthoester vorliegt, sind solche modernen Produkte nicht frei von Lähmungswirkung; die Wirkungsstärke ist aber im Vergleich zu den früher gebräuchlichen Estergemischen, die Vergiftungen in großer Zahl ausgelöst haben, auf etwa den 30. Teil vermindert (Neumann u. Henschler; Henschler[1,2]).

Wir berichten hier über die toxikologische Prüfung einiger Triarylphosphate, die in bezug auf technische Eigenschaften dem Trikresylphosphat nahe kommen, in denen das Kresol aber teilweise oder ganz durch Homologe ersetzt ist.

Methodik

Zur Wahl geeigneter Versuchstiere und Versuchstechniken haben wir früher kritisch Stellung genommen [Henschler (2)]. Als Vergleichsmaß der paralytischen Wirksamkeit dienten die Schwellendosen, die an Hühnern eben noch Lähmungserscheinungen hervorrufen. Da Triarylphosphate an verschiedenen Tierarten unterschiedlich wirken, prüften wir die wichtigsten Vertreter der Stoffgruppe orientierend auch an Katzen.

Als Standardsubstanz mit „100% Toxicität" diente das früher schon benutzte technische Trikresylphosphat mit 26,7% Orthokresol (Präp. 1 der Tab. 1). Die Mischtriarylphosphate[1] Nr. 3—5 der Tab. 1 wurden hergestellt durch Einsetzen der jeweiligen Äquivalente von Phenol bzw. seiner Homologen; sie sind also Gemische einer Vielzahl von Mischestern der Phosphorsäure. Für die reinen Triester (Nr. 8—13 der Tab. 2) wurden chemisch reine Dimethylphenole bzw. reines Phenol (Nr. 7) eingesetzt. Die in Tab. 1 genannten Orthokresolgehalte sind chromatographisch nach der Methode von STOLTENBERG bestimmt und als Prozent Trikresylphosphat (Mol 368) berechnet. Tetraorthokresylpyrophosphat (Präp. 14) wurde nach einer von TODD angegebenen Vorschrift aufgebaut.

Flüssige Präparate (Nr. 1—6, 8, 9 u. 14) wurden 1 : 1, Triphenylphosphat 1 : 4 mit Olivenöl gemischt, alle übrigen festen Substanzen 1 : 4 mit Milchzucker verrieben, in Gelatinekapseln verabfolgt.

Ergebnisse

Tabelle 1. *Toxicität technischer Ester bei einmaliger Verabfolgung*

Präp. Nr.	Bezeichnung	O-Kresol %	Prozent relative Toxicität	
			Hühner	Katzen
1	Trikresylphosphat aus Rohkresol DAB 4 M	26,7	100	100
2	Trikresylphosphat, Handelsprodukt	3,3	3	3
3	Diphenylmonokresylphosphat, Handelsprodukt	1,7	5	5—10
4	Diphenylmonokresylphosphat, Handelsprodukt	1,1	2,5	—
5	Diphenylmonoxylenylphosphat, Handelsprodukt	0,8	1,2—2,5	2,5—5
6	Trixylenylphosphat, Handelsprodukt	1,5	(1—3)*	1

* Vgl. Text.

Tab. 1 bringt die Ergebnisse der vergleichenden Untersuchung an 136 Hühnern und 29 Katzen.

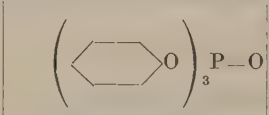
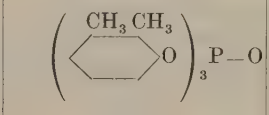
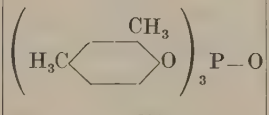
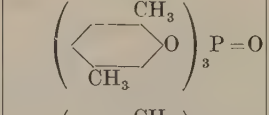
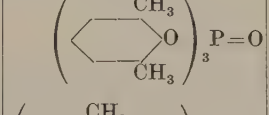
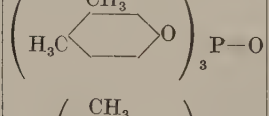
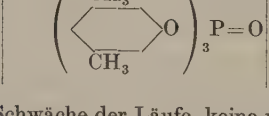
Der Wert für technisches Trixylenylphosphat (Präp. Nr. 6) an Hühnern ist aus mehreren subchronischen Versuchen mit täglichen Gaben von 0,1—2,5 g/kg abgeschätzt, da bei einmaliger Gabe zu große Mengen verabfolgt werden mußten, die nicht mehr vollständig resorbiert werden können.

Da die technischen Mischpräparate Nr. 3—5 und ebenso Trixylenylphosphat (Nr. 6) noch Lähmungswirkungen entfalten, haben wir die reinen Triester des Phenols (Nr. 7, Tab. 2) und sämtlicher 6 isomeren Dimethylphenole (Nr. 8—13) geprüft, die keinen nachweisbaren Gehalt an Orthokresol enthielten. Bei einmaliger Verabfolgung (große Mengen wurden auf 2—3 Tage verteilt) blieben Hühner nach Mengen bis zu 10 g/kg erscheinungsfrei. Die Ergebnisse einer chronischen Versuchsreihe sind

[1] Wir danken der Farbwerke Hoechst AG für die freundliche Überlassung aller untersuchten Präparate und für die Ausführung der Analysen.

in Tab. 2 zusammengestellt. Danach besitzt 2,3-Trixylenylphosphat eine vergleichsweise sehr schwache Lähmungswirkung. 2,4-Trixylenylphosphat ist etwas stärker wirksam, große Mengen dieses Esters ließen die Tiere nach progredienter Paralyse verenden.

Tabelle 2. *Wirkung von Triarylphosphaten (2,5 g/kg täglich) an je 2 Hühnern*

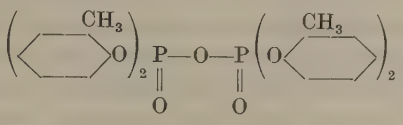
Präp. Nr.	Formel	Bezeichnung	Erste Sympt. nach Tagen	Gesamtdosis bis zu ersten Symptomen g/kg	Gesamtdosis überhaupt g/kg
7		Triphenylphosphat	—	—	30
8		2,3-Trixylenylphosphat	20	42,5	50*
9		2,4-Trixylenylphosphat	12	20	45**
10		2,5-Trixylenylphosphat	—	—	45
11		2,6-Trixylenylphosphat	—	—	45
12		3,4-Trixylenylphosphat	—	—	45
13		3,5-Trixylenylphosphat	—	—	45

* Schwäche der Läufe, keine volle Lähmung. ** † 21. bzw. 40. Tag.

Triphenylphosphat war in Bestätigung älterer Angaben (Smith u. Mitarb.) an Hühnern ohne Wirkung.

Technische Mischester, auch Trikresylphosphate, weisen eine höhere Toxicität auf, als nach der Prüfung reiner Ester zu erwarten wäre. Auf der Suche nach den Ursachen dafür zogen wir Verunreinigungen in Betracht, die in technischen, nicht aber in reinen Estergemischen

vorkommen könnten. Zur grundsätzlichen Entscheidung, ob evtl. Derivate der Pyrophosphorsäure Lähmungswirkung besitzen, verabfolgten wir Tetraorthokresylpyrophosphat (Nr. 14)



in steigenden Dosen einmalig und im subchronischen Versuch über 4 Wochen an Hühner per os und i.m. Bis zu 0,1 ccm/kg war keine Wirkung erkennbar. Höhere Dosen lösten das von insecticiden organischen Phosphorsäureestern und auch von dem analogen Tetraäthylpyrophosphat (TEPP) her bekannte Vergiftungsbild aus; ab 0,4 ccm/kg starben die Tiere dabei trotz Atropinverabreichung in wenigen Stunden. Bei keinem der überlebenden Hühner bildeten sich Lähmungen aus.

Besprechung

Die Versuche zeigen, daß *technische Mischtriarylphosphate* vom Typ der Diphenylmonokresylester *Lähmungswirkung* besitzen, *sofern sie* noch *Orthokresol enthalten*. Ihre Toxicität ist deutlich abhängig vom Orthokresolanteil (vgl. Tab. 1). Sie sind trotz ihres geringeren Orthokresolgehaltes etwa gleich stark wirksam wie ein modernes Trikresylphosphat (Präp. Nr. 2) mit rund 3% o-Kresol.

Auch technisches Diphenylmonoxylenylphosphat und Trixylenylphosphat, die noch etwas Kresol enthalten, sind toxisch im Sinne von Lähmungswirkung, wohl zur Hauptsache durch einen geringen Orthokresolanteil bedingt (vgl. Tab. 1). Da aber von den reinen Triestern aus Dimethylphenolen (vgl. Tab. 2), zwei (2,3-Trixylenylphosphat und 2,4-Trixylenylphosphat) geringe paralytische Wirkung besitzen, sind *wahrscheinlich auch Xylenylradikale in technischen Präparaten an der Gesamttoxicität beteiligt*. Die beiden schwach toxischen, reinen Triester, deren geringe Lähmungswirkung anderen Untersuchern (Hine u. Mitarb.) entgangen ist, sind als einzige Vertreter der Gruppe flüssig und mithin vermutlich gut resorbierbar. In flüssigen Mischpräparaten könnten dementsprechend auch die Radikale der beiden übrigen Dimethylphenole mit Orthokonfiguration — 2,5-Xylenol und 2,6-Xylenol — mitwirken. Unter den Trikresylphosphatmischestern besitzen solche mit nur einem Orthokresylrest die vergleichweise höchste Toxicität; analog könnten unter der Vielzahl der in technischen Mischpräparaten aus verschiedenen Phenolhomologen denkbaren Mischester solche mit einer dieser „toxophoren Orthogruppen" stärker wirken als entsprechende reine Triester. In welchem Maße diese Möglichkeiten im Spiele sind, kann derzeit nicht entschieden werden. Unsere vergleichenden Untersuchungen zeigen

jedenfalls, daß die von uns untersuchten technischen Mischtriarylphosphate in toxikologischer Hinsicht den orthoarmen Trikresylphosphaten gleichzustellen sind.

Triphenylphosphat erzeugt nur an Katzen Lähmungen, wenn auch etwas anderer Art als Trikresylphosphat (Smith u. Mitarb.); an keiner anderen Tierart, insbesondere nicht an Hühnern, ist ein der Trikresylphosphatvergiftung des Menschen vergleichbares Symptomenbild auszulösen. Über die *Wirkung von Triphenylphosphat beim Menschen* bzw. über evtl. vorgekommene Vergiftungen ist *nichts bekannt*, aus Tierversuchen ist sie z. Z. nicht abzuleiten. Die Abschätzung einer für den Menschen toxischen oder gar tödlichen Dosis von Triphenylphosphat (Hierholzer, Noetzel u. Schmidt) in Analogie zur toxischen Grenzdosis von Trikresylphosphat bleibt daher Spekulation.

Es kommt hinzu, daß über die kleinste beim Menschen toxische Grenzdosis von Trikresylphosphat vielfach falsche Vorstellungen bestehen. Nach Beobachtungen von Staehelin beträgt sie 0,5 g eines technischen Trikresylphosphats mit etwa 30—40% Orthokresol im Kresolanteil. Die früher hierauf gegründete Berechnung einer Grenzdosis von 0,12—0,15 g Triorthokresylphosphat ist unrichtig; die *Toxicität* derartiger *technischer Kresylphosphate beruht ganz überwiegend auf Mischestern mit nur einem Orthokresylrest* (Neumann u. Henschler; Henschler[1,2]).

Über die für den Menschen tödliche Dosis von Trikresylphosphat oder auch Triorthokresylphosphat ist nichts bekannt. Im Schrifttum sind zwei Todesfälle mitgeteilt (Vonderahe; Schmitt), bei denen ein Zusammenhang mit der Trikresylphosphataufnahme wahrscheinlich, aber nicht gesichert ist; über die dabei zur Wirkung gekommenen Trikresylphosphatmengen liegen keine Angaben vor. Dosis-Wirkungsbeziehungen aus Tierversuchen dürfen in unserem Falle nicht auf die Verhältnisse beim Menschen übertragen werden. Schon Van Esveld betont, daß zwar im Tierversuch die tödliche Dosis von Triorthokresylphosphat vier- bis fünffach über der minimal toxischen liegt, der Mensch aber nach klinischen Erfahrungen wenigstens das Zehn- bis Zwanzigfache der Dosis, die eben noch Lähmungen auslöst, ohne lebensbedrohliche Folgen einnehmen kann.

Bei *technischen Triphenylphosphaten* hingegen muß, wenn sie Orthokresol enthalten, mit Lähmungswirkung gerechnet werden; der Diphenylmono-o-kresylphosphorsäureester ist an Hühnern wirksam (Hine u. Mitarb.).

Das Auftreten von Pyrophosphorsäurederivaten in technischen Arylphosphaten ist auf Grund der Herstellungsweise und des hohen Siedebereichs der Pyrophosphate nicht anzunehmen, wäre aber theoretisch denkbar, da das bei der Synthese vorgelegte Phosphoroxychlorid ($POCl_3$) bei Kontakt mit Luft und Feuchtigkeit unter anderem in das Chlorid der Pyrophosphorsäure ($P_2O_3Cl_4$) übergehen kann (Besson), aus dem dann bei der Reaktion mit Phenolen entsprechende Ester entstehen könnten. Außerdem erschien die Vermutung, daß Arylester der Pyrophosphorsäure stärker wirken könnten als die entsprechenden Verbindungen der Orthophosphorsäure, a priori berechtigt, da Analoges von Alkylderivaten dieser Säuren bekannt ist: Beim Tetraäthylpyrophosphat (TEPP) liegt gegenüber dem Triäthylphosphat sowohl die Allgemeintoxicität als auch die insecticide Wirkung um Größenordnungen höher (Schrader).

Unsere Befunde mit Tetraorthokresylpyrophosphat zeigen, daß dieses ähnlich parasympathicomimetisch wirkt wie TEPP, sie machen aber eine *Beteiligung von Pyrophosphorsäureestern an der Lähmungswirkung von Triarylphosphaten unwahrscheinlich;* vermutlich wird trotz der Wasserunlöslichkeit des Tetraorthokresylpyrophosphats die Pyrobrücke im Organismus verseift. Das Spaltprodukt Diorthokresyl-orthophosphorsäure entfaltet keine Lähmungswirkung (Smith u. Stohlman).

Zusammenfassung

Untersuchungen an Hühnern und Katzen dienten der weiteren Aufklärung von Struktur-Wirkung-Beziehungen bei Triarylphosphaten, nachdem früher gezeigt worden war, daß beim Trikresylphosphat das Ausmaß der charakteristischen Lähmungen in bestimmter Weise vom Orthokresolgehalt abhängt.

Technische Triarylphosphate, deren Aromatenanteil ganz oder teilweise aus Phenol und/oder Xylenolen besteht, wirken paralytisch, wenn sie noch Orthokresyl enthalten. Wahrscheinlich können aber auch Xylenylreste mit orthoständigen Methylgruppen ähnliche Effekte erzeugen, da reine Triester aus 2,3- und 2,4-Dimethylphenol noch schwach lähmen und technische Mischtriarylphosphate mit rund 1,5% Orthokresol gleich stark wirken wie Trikresylphosphate mit rund 3% Orthokresol.

Die Wirkung von Triphenylphosphat beim Menschen ist direkt nicht bekannt und kann aus Tierversuchen z. Z. nicht beurteilt werden; enthalten technische Präparate aber Orthokresyl, so ist Lähmungswirkung im Prinzip noch möglich.

Pyrophosphorsäureester sind sehr wahrscheinlich an der paralytischen Wirkung von technischen Triarylphosphaten nicht beteiligt. Tetraorthokresylpyrophosphat ist ein ähnliches Parasympathicomimeticum wie Tetraäthylpyrophosphat (TEPP), erzeugt aber bei Hühnern keine Lähmungen.

Literatur

Besson, A.: Compt. rend. Acad. Sc., Paris **124**, 1099 (1897). — van Esveld, L. W.: Pharmac. Weekbl. **68**, 1117 (1931). — Ber. Zentrallab. f. d. öff. Ges. Pfl. Utrecht, Abt. Pharmakol. **1933**, 698. — Henschler, D.: (1) Naunyn-Schmiedebergs Arch. exp. Path. Pharmak. **232**, 223 (1958). — (2) erscheint an anderer Stelle. — Hierholzer, H., H. Noetzel u. L. Schmidt: Arzneimittel-Forsch. **7**, 585 (1957). — Hine, C. H., M. K. Dunlap, E. G. Rice, M. M. Coursey, R. M. Gross and H. H. Anderson: J. Pharmacol. exp. Ther. **116**, 227 (1956). — Neumann, W., u. D. Henschler: Naturwissenschaften **44**, 329 (1957). — Schmitt, H.: Med. Diss. Heidelberg 1948. — Schrader, G.: Die Entwicklung neuer Insektizide auf Basis organischer Phosphorsäureester, Weinheim: Verl. Chemie 1952. — Smith, M. I., E. W. Engel and E. F. Stohlman: Publ. Hlth Rep. (Wash.) **47**, 1 (1932). — Smith, M. I., and E. F. Stohlman: J. Pharmacol. exp. Ther. **51**, 217 (1934). — Stoltenberg, H.: Z. analyt. Chem. **146**, 181 (1955). — Todd, A.: J. chem. Soc. **1952** II, 1234. — Vonderahe, A. R.: Arch. Neurol. Psychiat. (Chicago) **25**, 29 (1931).

Dr. Dietrich Henschler,
Pharmakolog. Institut der Univ. Würzburg, Koellikerstr. 2

Arch. exper. Path. u. Pharmakol., Bd. 233, S. 518—530 (1958)

Aus dem Pharmakologischen Institut der Universität Frankfurt am Main
(Direktor: Prof. Dr. P. Holtz)

Über die Wirkung von 5-Hydroxytryptamin (Serotonin) auf die Atmung*

Von
E. Westermann

Mit 9 Textabbildungen

(Eingegangen am 15. Dezember 1957)

Die beim *Hund* durch Serotonin ausgelöste *Hyperpnoe* kommt nach Douglas u. Toh sowie nach McCubbin, Green, Salmoiraghi u. Page wesentlich durch eine Erregung der Chemoreceptoren des *Glomus caroticum* zustande. Heymans u. van den Heuvel-Heymans jedoch nehmen eine direkte Stimulierung des *Atemzentrums* an, da die in ihren Versuchen durch Injektion von Serotonin in die A. carotis verursachte Hyperpnoe auch nach Denervierung des Carotissinus in gleicher Stärke und mit der gleichen Latenzzeit auftrat. — Im Gegensatz zum Hund reagiert die *Katze* auf Serotonin mit einer primären *Apnoe*. Diese wird von Schneider u. Yonkman mit einer Reizung pulmonaler Dehnungsreceptoren erklärt, da Vagotomie und Durchtrennung des Rückenmarks in Höhe von C_6 die Wirkung verhinderte.

Zur Klärung des Angriffspunktes haben wir Serotonin bei *Hunden* und *Katzen* in verschiedene Abschnitte des Kreislaufsystems injiziert und die Wirkung auf die Atmung zu der Wirkung anderer Pharmaka mit bekanntem Angriffspunkt — *Lobelin, Veratrin* — in Vergleich gesetzt; ferner andere Tierarten — *Ratten* und *Meerschweinchen* — in den Kreis der Untersuchungen einbezogen und schließlich geprüft, wie sich die Wirkungen des Serotonins auf die Atmung pharmakologisch beeinflussen lassen.

Methodik

Narkose. Hunde erhielten Pernocton (70 mg/kg i.m.) oder Morphin-Chloralose (2 mg/kg Morphin. hydrochl./kg s.c., 75 mg/kg Chloralose + 75 mg/kg Urethan i.v.); *Katzen* entweder Pernocton (70 mg/kg i.m.) oder Chloralose-Urethan (100 mg/kg Chloralose + 100 mg/kg Urethan p.o. mit der Schlundsonde); *Meerschweinchen* und *Ratten* Urethan (1,2—1,5 g/kg s.c.). Hemmung der Blutgerinnung bei *Hunden* und *Katzen* durch 10 mg/kg polyäthensulfosaures Natrium i.v., bei *Meerschweinchen* und *Ratten* durch 10—20 mg/kg Vetren i.v.

Die *i.v. Injektionen* erfolgten bei Hunden, Katzen und Ratten in die V. femoralis, bei Meerschweinchen in die V. jugularis; die *i.a. Injektionen* bei Hunden und Katzen in die A. carotis com., wobei — um die Blutzufuhr nicht zu unterbrechen — der zentrale und periphere Stumpf der durchschnittenen Arterie mit einem dünnen

* Ausgeführt mit Unterstützung der Deutschen Forschungsgemeinschaft.

Gummischlauch verbunden war, in den hinein die Injektionen erfolgten. In anderen Versuchen injizierten wir in die A. lingualis, einen Seitenast der A. carotis ext., nach Unterbindung der A. Carotis ext. distal vom Abgang der A. lingualis, so daß das Pharmakon in die A. carotis com. bzw. A. carotis int. gelangte. In wieder anderen Versuchen wurde mit Hilfe eines von der A. femoralis aus herzwärts vorgeschobenen Polyäthylenkatheters bei Hunden in verschiedene Abschnitte der Aorta injiziert. Die Lage der Katheterspitze wurde nach dem Versuch autoptisch kontrolliert.

Der *Blutdruck* wurde in den meisten Versuchen bei Hunden und Katzen in der A. femoralis, bei Meerschweinchen und Ratten in der A. carotis com. mit Hilfe eines Stathamelementes (0—750 mm Hg; 12 Volt max.) ohne zwischengeschaltete Verstärkeapparatur über ein empfindliches, schnellschwingendes Spiegelgalvanometer ($3{,}3 \cdot 10^{-7}$ Amp.; 95 Hz) optisch registriert. — Die Registrierung der *Atmung* erfolgte mit Hilfe eines empfindlicheren Stathamelementes (0—50 mm Hg; 12 Volt max.), das an ein Seitenstück der Trachealkanüle angeschlossen war, über ein Spiegelgalvanometer ($5{,}2 \cdot 10^{-8}$ Amp.; 25 Hz). Ausschläge nach oben = Exspiration.

Änderungen des *Lungenvolumens* wurden nach der Methode von Konzett u. Rössler gemessen, die wir für optische Registrierung modifizierten: durch den Hebel des Pistonrekorders wurde ein Weicheisenstab im Meßkopf eines Rotameters bewegt, der in Originalschaltung nach Shipley u. Wilson mit einem Galvanometer (7,9 Hz; $4 \cdot 10^{-8}$ Amp.) verbunden war. Der *Bronchialdruck* wurde bei künstlicher Beatmung im zuführenden Schlauch der Atempumpe, der *Trachealdruck* mit einer oberhalb der Trachealkanüle eingeführten, wassergefüllten Ballonsonde mit Hilfe von Stathamelementen über Spiegelgalvanometer registriert. Die *Thoraxbewegungen* wurden über einen Schreibhebel, der mit einem im Rippenwinkel befestigten Faden verbunden war, die *Nickhautkontraktionen* isometrisch mit Hilfe eines Stathamelementes über Spiegelgalvanometer registriert. — In einigen Versuchen erfolgte die Blutdruckschreibung mit Hilfe eines Hg-Manometers, die Aufzeichnung der Atmung aus einem Seitenstück der Trachealkanüle mit Hilfe einer Mareyschen Kapsel auf ein Rußkymographion. In den Versuchen mit optischer Registrierung erfolgte die Zeitschreibung in 10 Sekundenintervallen.

Injizierte Substanzen[1]. *Serotonin* (5-Hydroxytryptamin-kreatininsulfat), C. H. Boehringer Sohn (Ingelheim); *Lobelin. hydrochl.*, C. H. Boehringer Sohn (Ingelheim); *Veratrin. hydrochl.*; *Suprarenin basic.*, Farbwerke Hoechst; *Atropin. sulfuric.*; *Pendiomid* (N,N,N′,N′-3-Pentamethyl-N,N′-diäthyl-3-azapentylen-(1,5)-diammoniumdichlorid), Ciba A. G. (Wehr/Baden); *Pantocain* (4-Butylaminobenzoyldimethylaminoäthanol), Farbwerke Hoechst; *Histamindihydrochlorid*, Hoffmann-La Roche A. G. (Grenzach/Baden); *Hibernon* (m-Brombenzyl-α-pyridyl-dimethylaminoäthylamin-hydrochlorid), Diwag Chemische Fabriken A. G. (Berlin-Waidmannslust); *Regitin* [2-(N-p-Tolyl-N-m-oxyphenyl-aminomethyl)-imidazolin], Ciba (Wehr/Baden); *Dihydroergotamin*, Sandoz (Nürnberg); Lysergsäurediäthylamid, „Delysid", Sandoz (Nürnberg); *Vetren* (1 mg = 100 IE Heparin), Chemische Fabrik Promonta G.m.b.H. (Hamburg).

Die Ergebnisse wurden in Versuchen an 13 Hunden, 15 Katzen, 11 Meerschweinchen und 10 Ratten gewonnen.

Versuche an Hunden

Die *intravenöse* (*i.v.*) Injektion von Serotonin verursacht in dem Versuch der Abb. 1 A eine *Hyperpnoe*, an die sich eine *Apnoe* anschließt. Die nach 8 γ/kg Serotonin auftretende Hyperpnoe ist stärker als die

[1] Den Herstellerfirmen danken wir für die Überlassung von Versuchsmengen.

nach 4 γ/kg auftretende. — Die Wirkung der *intraarteriell* (*i.a.*) in einen Seitenast der A. carotis (A. lingualis) injizierten gleichen Dosen ist viel schwächer: die Hyperpnoe ist nur angedeutet, zu einer vollständigen Apnoe kommt es überhaupt nicht. Es ist deshalb nicht anzunehmen, daß der Angriffspunkt der Wirkung überwiegend im Glomus caroticum oder im Atemzentrum liegt.

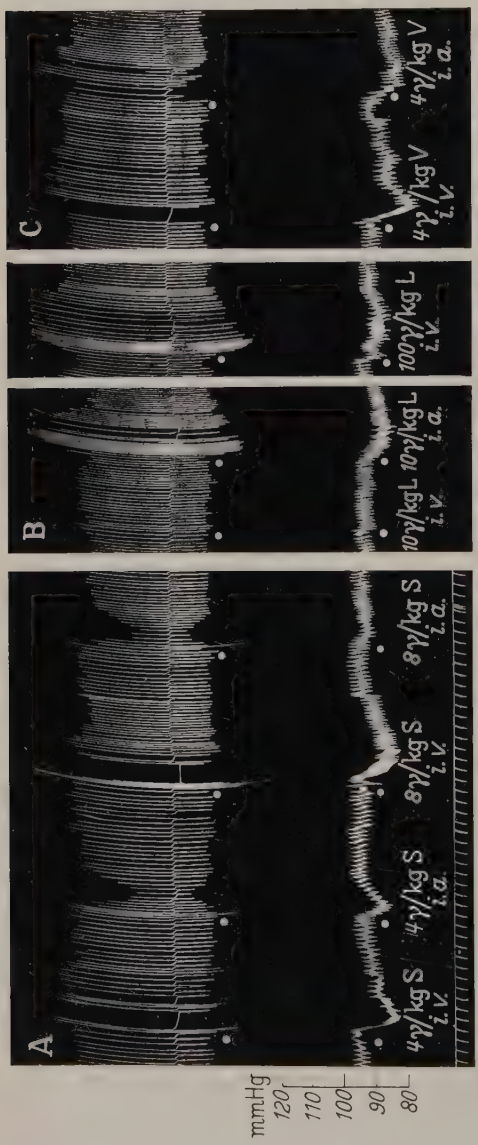


Abb. 1. *Wirkung von Serotonin, Lobelin und Veratrin auf die Atmung des Hundes.* Hund 8,5 kg. Pernoctonnarkose. Obere Kurve: Atmung. Untere Kurve: Blutdruck in A. femoralis. *i.v.* Injektion in V. femoralis; *i.a.* Injektion in A. lingualis; *S* Serotonin; *L* Lobelin; *V* Veratrin. Zeitschreibung: 10 sec

Das geht auch aus dem gerade entgegengesetzten Verhalten eines anderen Pharmakons hervor, von dem bekannt ist, daß es durch Stimulierung der im Glomus caroticum gelegenen Chemoreceptoren Hyperpnoe verursacht. Im gleichen Versuch, in dem *Serotonin* bei i.v. Injektion weit stärker wirkt als bei Injektion in die A. lingualis, ist *Lobelin* (10 γ/kg) bei i.v. Injektion vollkommen wirkungslos, während die Injektion in die A. carotis eine deutliche Hyperpnoe verursacht, die bei i.v. Applikation erst mit der 10fach höheren Dosis (100γ/kg) erzielt wird (Abb. 1B). — *Veratrin* führt demgegenüber bei i.v. Injektion zu reiner *Apnoe*, bei Injektion der gleichen Dosis in die A. carotis zu Störungen der Atmung, die nach einer kurz dauernden und nur schwachen hypopnoischen Phase in einer längerdauernden Tachypnoe bestehen (Abb. 1C).

Die Wirkung des Serotonins auf die Atmung blieb durch ganglionäre Blockade mit *Pendiomid* (2—5 mg/kg) und durch Vorbehandlung mit *Atropin* (0,1—1,0 mg/kg) unbeeinflußt; durch *Pantocain* (2 mg/kg) hingegen ließ sie sich fast vollständig verhindern.

Injiziert man Serotonin in einer Dosierung, die i.v. gegeben, eine deutliche Hyperpnoe hervorruft, bei Injektion in die A. lingualis jedoch unwirksam ist, mit Hilfe eines von der A. femoralis vorgeschobenen Katheters in die Aorta, so tritt ebenfalls eine Hyperpnoe auf, wenn die Injektion in die Aorta *ascendens*, nicht aber, wenn sie in die Aorta *descendens* erfolgt. Die kurze Latenz der Wirkung weist darauf hin, daß der Injektionsstelle nahegelegene Rezeptorenfelder stimuliert werden. Als solche kämen die Chemoreceptoren des Arcus aortae (Glomus aorticum) in Frage.

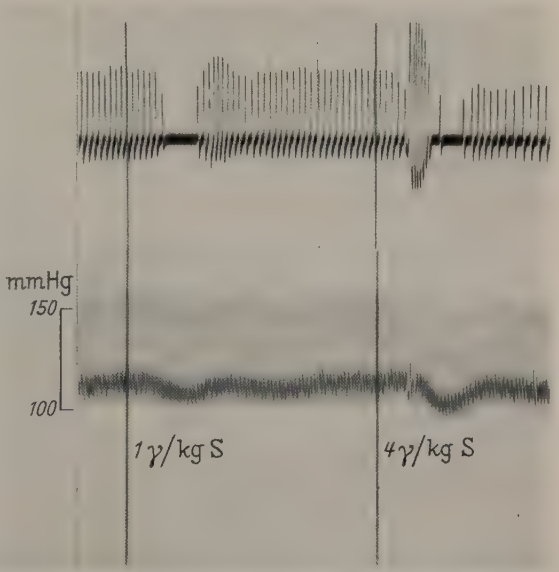


Abb. 2. *Primäre Apnoe beim Hund nach kleinen Serotonindosen.* Hund 27,5 kg. Pernoctonnarkose. Obere Kurve: Atmung. Untere Kurve: Blutdruck in A. femoralis. *S* Serotonin i.v.

Sehr kleine Serotonindosen können beim *Hund* in seltenen Fällen auch eine *reine Apnoe* — ohne vorangehende Hyperpnoe — verursachen. In dem Versuch der Abb. 2 führte 1 γ/kg Serotonin zu einer etwa 10 sec lang anhaltenen Apnoe, während die höhere Dosis von 4 γ/kg eine deutliche Hyperpnoe auslöste, der erst sekundär die Apnoe folgte.

Versuche an Katzen

Was beim *Hund* nur in niedriger Dosierung erfolgt und auch dann die Ausnahme ist, ist bei der *Katze* die Regel: eine *Apnoe* nach der i.v. Injektion jeder überhaupt atmungswirksamen Serotonindosis, an die sich sekundär eine Hyperpnoe anschließen kann. Die *Apnoe* bei der Katze scheint wesentlich durch eine Beeinflussung pulmonaler Receptoren verursacht zu sein: bei i.v. Injektion von Serotonin setzt sie fast *gleichzeitig* mit der *Bradykardie* ein und ist schon abgeklungen, wenn das Pharmakon die Nickhaut erreicht und diese zur Kontraktion bringt (Abb. 3A). Die gleiche Serotonindosis — in die A. carotis injiziert —

löst zwar eine sofort einsetzende und weit stärkere *Nickhaut*kontraktion aus, aber nur eine schwache Depression der Atmung und keine Bradykardie (Abb. 3B).

In gleicher Weise wie die ganz ähnliche *Veratrinwirkung* auf Herz und Atmung (Bradykardie, Blutdrucksenkung und Apnoe), wird die Wirkung des i.v. injizierten Serotonins durch *Atropin* beeinflußt: Atropin verhindert die *Bradykardie* und Blutdrucksenkung, nicht aber

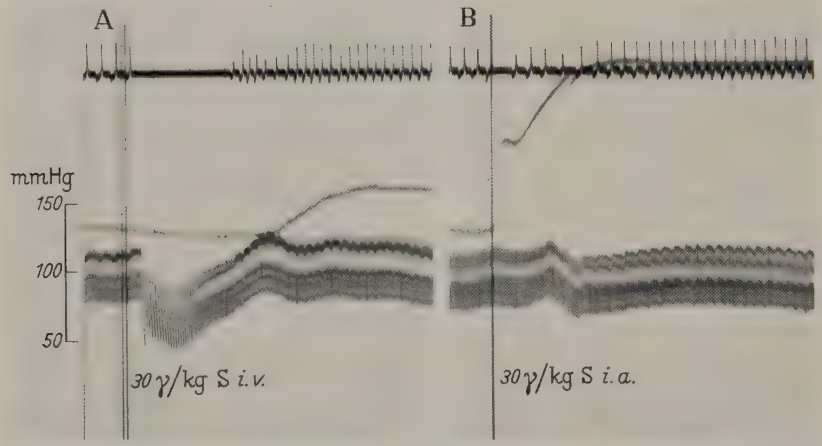


Abb. 3. *Wirkung des Serotonins auf die Atmung der Katze.* Katze 3,2 kg. Pernoctonnarkose. Obere Kurve: Atmung. Mittlere Kurve: Nickhaut. Untere Kurve: Blutdruck in A. femoralis. *i.v.* Injektion in V. femoralis; *i.a.* Injektion in A. carotis commun; *S* Serotonin

die *Apnoe*. Demgegenüber wird die durch Serotonin ausgelöste reflektorische Apnoe durch beiderseitige *Vagotomie* fast aufgehoben — und die vor der Vagusdurchschneidung blutdrucksenkende in eine blutdrucksteigernde Wirkung umgewandelt (Abb. 4A u. B). Die *afferente* Bahn des zu Apnoe führenden Reflexes verläuft somit offensichtlich im Vagus.

Höhere Serotonindosen können auch bei Injektion in die A. carotis eine Apnoe verursachen, die sich aber von der nach i.v. Injektion auftretenden dadurch unterscheidet, daß sie ohne Latenz einsetzt (Abb. 4A) und durch bilaterale Vagotomie nicht abgeschwächt wird (Abb. 4B). Das spricht für die Möglichkeit auch eines zentralen Angriffspunktes.

Die nach Vagotomie bei i.v. Injektion von Serotonin noch bestehen bleibende, in einem Kleinerwerden der Atemexkursionen zum Ausdruck kommende „Depression" der Atmung könnte durch eine direkte *bronchoconstrictorische* Wirkung bedingt sein. Dafür spricht, daß sie wie die Kontraktionswirkung des Serotonins auf andere glattmuskelige Organe (Darm, Uterus) zwar weitgehend *atropinresistent* ist, durch *Sympathicolytica* aber verhindert wird (Abb. 4C).

Schon kleine Serotonindosen (2,5—10 γ/kg) verursachen an der Katze bei i.v. Injektion eine Erhöhung des Tracheal- und Bronchialdrucks (Abb. 5). Wie das Sympathicolyticum *Regitin* die Kontraktionswirkung des Serotonins am isolierten Trachealring verhindert (Abb. 6), so unterdrückt es auch in vivo die bronchoconstrictorische Wirkung[1]. — In der Abb. 7 wird die Serotonin- mit der Histaminwirkung verglichen (A). Beide bleiben durch *Pantocain* unbeeinflußt oder werden sogar etwas verstärkt. Das Antihistaminicum *Hibernon* verhindert spezifisch die Histaminwirkung (B). Die bronchoconstrictorische Wirkung des Serotonins läßt sich schließlich auch nicht durch *Atropin*, wohl aber durch *Regitin* verhindern (C).

Die durch i.v. injiziertes Serotonin an der Katze ausgelöste *Apnoe* scheint demnach überwiegend durch eine Stimulierung pulmonaler Receptoren mit vagalen Afferenzen, daneben — bei intraarterieller (A. carotis) Injektion ausschließlich — zentral bedingt zu sein: bilaterale Vagotomie verhindert die bei *i.v.* Injektion durch Stimulierung vagal-pulmonaler Receptoren verursachte, nicht aber die bei *intraarterieller* (A. carotis) Injektion zustande kommende Apnoe.

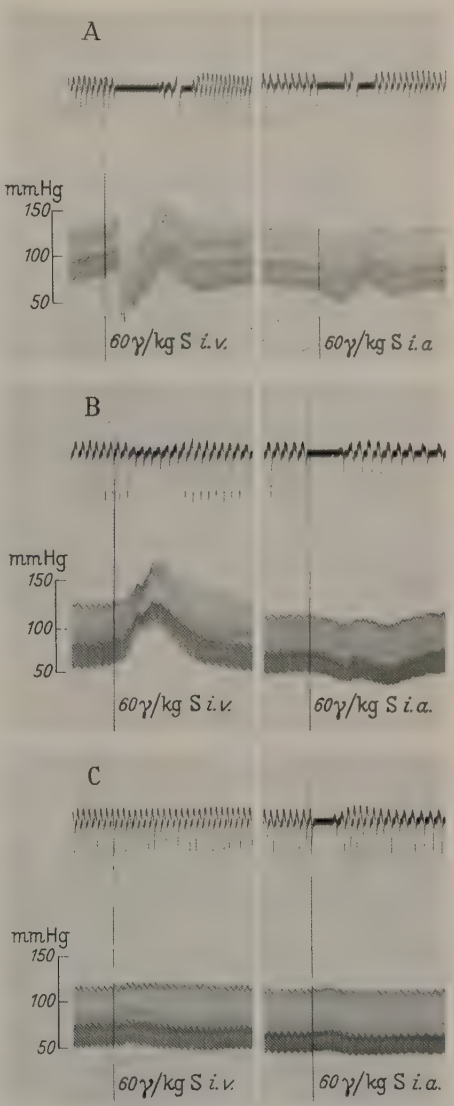


Abb. 4. *Beeinflussung der Serotoninwirkung durch Vagotomie und Regitin.* Katze 1,8 kg. Pernoctonnarkose. Obere Kurve: Atmung (in diesem Versuch ausnahmsweise Ausschläge nach unten = Exspiration). Untere Kurve: Blutdruck in A. femoralis. *i.v.* Injektion in V. femoralis; *i.a.* Injektion in A. carotis commun. A vor, B nach Vagotomie, C nach 1 mg/kg Regitin; *S* Serotonin

Versuche an Ratten und Meerschweinchen

An *Ratten* kann Serotonin bei i.v. Injektion überwiegend *apnoische* oder überwiegend

[1] Vgl. hierzu die kurze Mitteilung Balzer, Greeff u. Westermann: „Die bronchoconstrictorische Wirkung des Serotonins", Klin. Wschr. **1956**, 1204.

hyperpnoische Atemreaktionen auslösen. Im Versuch der Abb. 8A kam es nach 20 γ/kg Serotonin i.v. zu reiner *Hyperpnoe*, im Versuch der Abb. 8B hingegen zu *Apnoe*. Diese ist mit einer starken *Bradykardie* verbunden, die bei der überwiegend hyperpnoischen Atemreaktion fehlt.

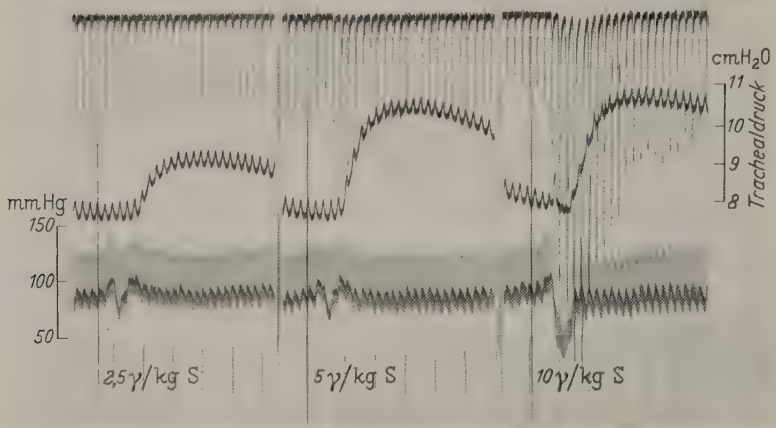


Abb. 5. *Tracheal- und Bronchokonstriktion durch Serotonin.* Katze 2,7 kg. Chloralose-Urethannarkose. Obere Kurve: Bronchokonstriktion (registriert nach KONZETT u. RÖSSLER) (Ausschläge nach unten Abnahme des Lungenvolumens). Mittlere Kurve: Trachealdruck (siehe Methodik). Untere Kurve: Blutdruck in A. femoralis. *S* Serotonin i.v.

Beim *Meerschweinchen* kommt es auch nach den niedrigsten, überhaupt wirksamen Serotonindosen zu einer *Hyperpnoe*. Nach 10—20 γ/kg i.v. nimmt die Atemfrequenz zu; die Atemexkursionen werden größer. Nach höheren Dosen (20—40 γ/kg) schließt sich an die initiale Hyperpnoe eine Abnahme der Lungenventilation an. Im Versuch der Abb. 9, in dem auch die Thoraxbewegungen registriert wurden, kam es nach 60 γ/kg Serotonin im Anschluß an die primäre Hyperpnoe zu einer starken, in der Kurve als „Apnoe" imponierenden Abdrosselung der Atmung, während der jedoch die Atem*bewegungen* verstärkt waren. Es handelt sich demnach nicht um eine echte *Apnoe*, sondern um eine *Bronchokonstriktion*, die die Lungenventilation so stark vermindert, daß die Registrierung keine Ausschläge mehr gibt, und dadurch einen *Atemstillstand* vortäuscht.

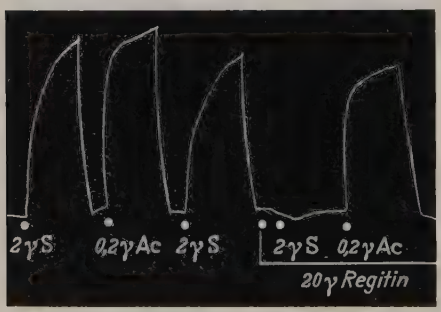


Abb. 6. *Serotoninwirkung am isolierten Trachealring. Beeinflussung durch Regitin.* Isolierter Trachealring der Katze. Tyrodebad: 20 ml. *S* Serotonin; *Ac* Acetylcholin

Die scheinbare „Apnoe" läßt sich denn auch wie die Bronchokonstriktion an der Katze (Abb. 7) und die Kontraktion des isolierten Trachealrings (Abb. 6) durch Sympathicolytica, z. B. Regitin oder Dihydroergotamin — und durch das bronchodilatatorische *Adrenalin* abschwächen bzw. aufheben.

Sehr hohe Serotonindosen (z. B. 150 γ/kg i.v.), verursachen auch beim Meerschweinchen eine *echte* Apnoe mit Stillstand der Atembewegungen, die von der bronchoconstrictorisch bedingten scheinbaren

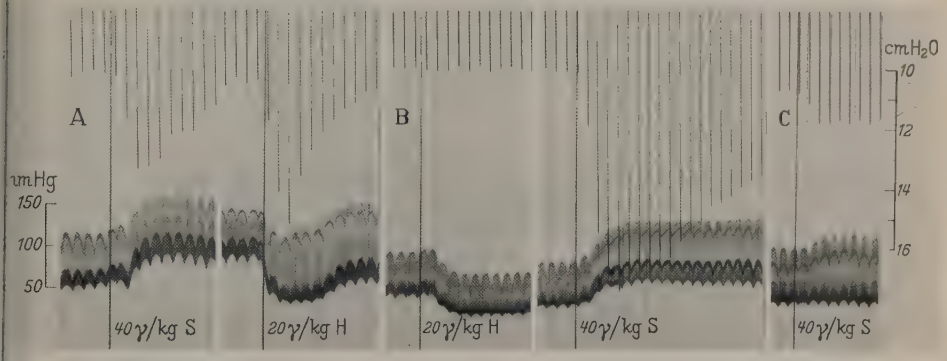


Abb. 7. *Beeinflussung der bronchoconstrictorischen Wirkung des Serotonins und Histamins durch Hibernon und Regitin.* Katze 2,5 kg. Chloralose-Urethannarkose. Obere Kurve: Bronchialdruck (siehe Methodik). Untere Kurve: Blutdruck in A. femoralis. i.v. Injektion von: *S* Serotonin, *H* Histamin. A vor, B nach 1 mg/kg Hibernon i.v.; C nach 4 mg/kg Regitin i.v.

„Apnoe" überdauert wird. *Regitin* verhindert beide und schwächt auch die Blutdrucksteigerung ab, die zum Teil wohl durch eine Adrenalinabgabe aus dem Nebennierenmark verursacht ist.

Diskussion

1. Das *Meerschweinchen* unterscheidet sich von anderen Tierarten unter anderem darin, daß die automatische, eine rhythmische Tätigkeit gewährleistende Funktion des Atemzentrums, die sonst weitgehend von peripheren („extrinsic"), vagal-afferenten Impulsen unabhängig ist, bei ihm in hohem Maße auf eine dauernde proprioceptive Förderung durch die Vagi angewiesen ist, und es beim unbetäubten oder in Barbituratnarkose befindlichen Tier zum Atmungsstillstand in Exspiration kommt, wenn beide Vagi durchschnitten werden. Das hat dazu geführt, daß man beim Meerschweinchen den Vagus funktionell in die sogenannte „intrinsic" Regulation der Atmung mit einbezieht (Oberholzer u. Schlegel; Wyss).

Die vagale Kontrolle der Atmung ist eine zweifache: schwache und niederfrequente Reizung des zentralen Vagusstumpfes *stimuliert* den inspiratorischen Anteil der Atmung, ähnlich wie das die schwache Erregung der pulmonalen Dehnungsreceptoren bei kleinem Lungenvolumen am Ende der expiratorischen Phase

tut; hochfrequente Reizung löst dagegen ähnlich wie die inspiratorische Lungendehnung eine exspiratorische Reaktion mit Inspirations*hemmung* aus, die in vollständige Apnoe übergehen kann.

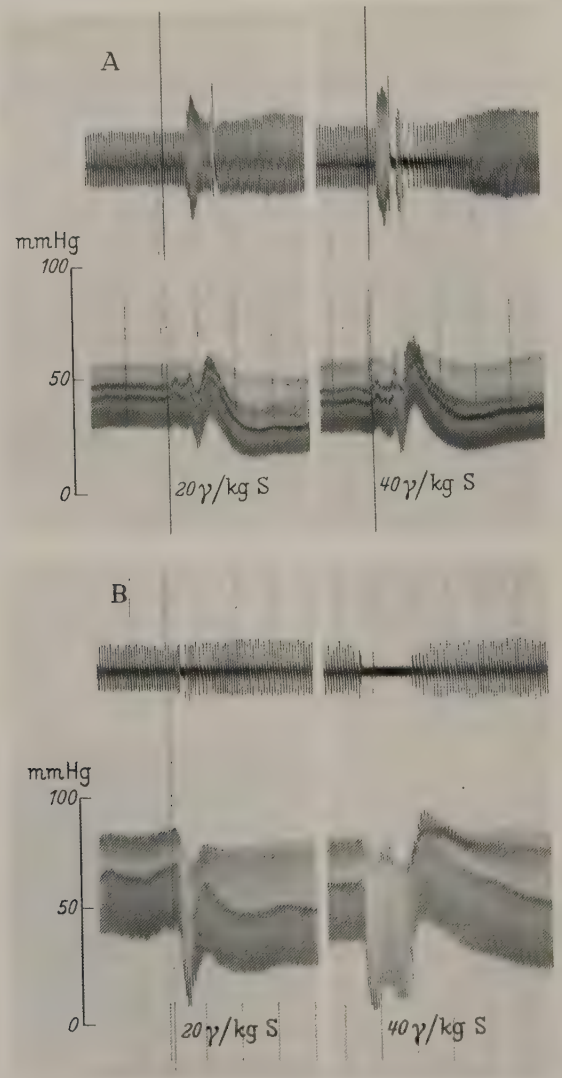


Abb. 8. *Hyperpnoische und apnoische Wirkung des Serotonins an der Ratte.* A Ratte 320 g; B Ratte, 350 g. Urethannarkose. *S* Serotonin i.v.

So wird vielleicht verständlich, daß eine Tierart, bei der das Atemzentrum schon unter physiologischen Verhältnissen auf die dauernde Stimulierung durch vagal-reflektorische Impulse angewiesen ist, auf

Serotonin innerhalb eines weiten Dosierungsbereiches nicht — wie z. B. die Katze — mit Apnoe reagiert, und daß erst sehr hohe Dosen, ähnlich wie eine hochfrequente Reizung des zentralen Vagusstumpfes, durch eine reziproke intrazentrale Hemmung Apnoe verursachen.

2. Im Gegensatz zum Meerschweinchen ist die zentrale Selbststeuerung der Atmung bei der *Katze* von fördernden peripher-vagalen Einflüssen weitgehend unabhängig und unterliegt sogar einer dauernden physiologischen Hemmung durch das bulbär-inhibitorische System der Formatio reticularus. Schaltet man nämlich diesen hemmenden Einfluß durch Hirnstammdurchschneidung in Höhe des kapitalen Teils des Pons aus, so kommt es bei der Katze besonders leicht zu Inspirationskrämpfen (Apneusis) (Marckwald; Bucher).

Jede überhaupt wirksame Serotonindosis führt in der Regel bei der Katze zu Apnoe. Hierzu sind bei Injektion in die A. carotis höhere Dosen erforderlich als bei i.v. Injektion. Im ersten Fall dürfte die Apnoe durch eine direkte Erregung des bulbär-inhibitorischen Systems der Formatio reticularis zustande kommen; im zweiten Fall durch die Stimulierung von Receptoren, die von einem i.v. verabfolgten Pharmakon in höherer Konzentration erreicht werden als von einem in die A. carotis injizierten. Das dürften *pulmonale* Receptoren sein.

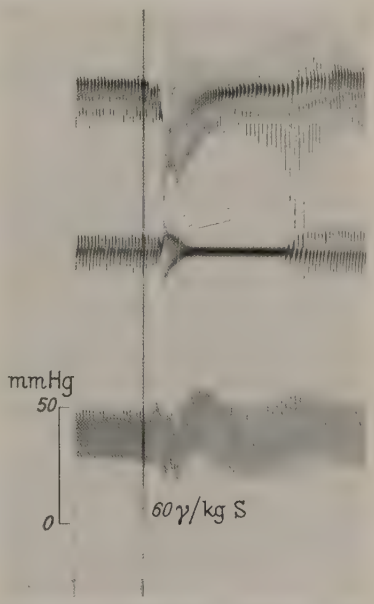


Abb. 9. *Serotoninwirkung auf Lungenventilation und Atembewegungen des Meerschweinchens (Scheinbare Apnoe).* Meerschweinchen, 400 g. Urethannarkose. Obere Kurve: Thoraxbewegungen. Mittlere Kurve: Atmungsregistrierung im Seitenstück der Trachealkanüle. Untere Kurve: Blutdruck in A. carotis. *S* Serotonin i.v.

Neben im Lungengewebe und in der Pleura sowie im Tracheal- und Bronchialbereich gelegenen Dehnungsreceptoren, deren Erregungszustand vom Lungen*volumen* abhängt, indem sie durch den mit jeder Volumenänderung verbundenen Dehnungsreiz erregt werden und auf dem Wege der Nn. vagi Impulse zum bulbären Atmungssteuerungszentrum entsenden (Hering-Breuer), sind Receptoren in den Lungen*gefäßen* beschrieben worden, von denen sich durch Druckanstieg über den afferenten Vagus *Apnoe* und Blutdrucksenkung auslösen lassen (Churchill u. Cope). Die bei der Katze nach i.v. Injektion von Serotonin regelmäßig auftretende *Apnoe* könnte somit durch eine Stimulierung dieser „Pressoreceptoren" der Pulmonalgefäße verursacht sein, die z. B. auch auf *Veratridin* empfindlicher reagieren als die Hering-Breuerschen Dehnungsreceptoren (Aviado, Pontius u. Schmidt). Daß diese vasculären Receptoren für die bei der Katze auftretende Apnoe mitverantwortlich sind, wird ferner durch Untersuchungen von Mott u. Paintal

wahrscheinlich, in denen die zu Apnoe führende Wirkung der Dehnungsreceptoren (Hering-Breuer) sich durch Unterkühlung der Vagi ausschalten ließ, nicht aber die durch Serotonin verursachte Apnoe. Diese wurde erst durch Vagotomie verhindert. — Als *adäquater Reiz* für die in den Lungengefäßen gelegenen Receptoren, die nach Daly u. Mitarb. empfindlicher auf eine Druckerhöhung in den Lungen*venen* als in der A. pulmonalis reagieren, kommt u. a. *Serotonin* in Frage (Comroe u. Mitarb.), so daß bei einer Lungenembolie nicht nur der *mechanische* Reiz des Embolus, sondern auch die aus ihm erfolgende Freisetzung von Serotonin an der Auslösung der im Gefolge der Embolie auftretenden Atmungsstörungen beteiligt ist.

3. Ähnlich wie das Meerschweinchen reagiert auch der *Hund* auf Serotonin in der Regel primär mit einer Hyperpnoe, auf die meistens eine Apnoe folgt.

Elektrophysiologische Untersuchungen haben ergeben, daß an der zentralen Steuerung der Atmung Areale beteiligt sind, deren elektrische Stimulierung eine Erregung, und andere, deren Stimulierung eine Hemmung verursachen. Von einem „Inspirationszentrum" gehen inspirationsfördernde, von einem „Exspirationszentrum" inspirationshemmende Einflüsse aus. In der unterhalb der Formatio reticularis gelegenen grauen Substanz des Hirnstammes ließ sich ein „Initiativzentrum" der Atmung lokalisieren, dessen Stimulierung durch eine Aktivierung inspiratorischer und exspiratorischer Reticularneurone zu Hyperpnoe führt (Wyss). Eine Hemmung des Inspirationszentrums kann durch eine Stimulierung des bulbär-inhibitorischen Systems der Formatio reticularis zustande kommen (Gangloff u. Monnier).

Die durch Serotonin verursachte *Hyperpnoe* ist bei i.v. Injektion und bei Injektion in die Aorta ascendens stärker als bei Injektion in die A. carotis. Daß sie aber nicht nur peripher-reflektorisch, sondern auch direkt zentral auslösbar ist, geht aus den erwähnten Versuchen von Heymans u. van den Heuvel-Heymans hervor, in denen Serotonin nach Durchschneidung der Carotissinusnerven bei Injektion in die A. carotis noch Hyperpnoe verursachte. Sie kann somit sowohl durch eine direkte (höhere Dosen) als eine reflektorische, über das glomus aorticum erfolgende (kleinere Dosen) Stimulierung des Initiativzentrums ausgelöst werden. — Auch die an die Hyperpnoe sich anschließende *Apnoe* ist sowohl peripher als zentral bedingt: Die nach *kleinen* Serotonindosen (1 γ/kg i.v.) auftretende reine Apnoe dürfte ausschließlich reflektorisch durch eine Erregung pulmonaler Receptoren verursacht sein. Die nach *größeren* Dosen sich an die Hyperpnoe anschließende Apnoe könnte daneben auch zentral bedingt sein: durch eine — ähnlich wie bei der Katze — direkte Erregung des bulbär-inhibitorischen Systems der Formatio reticularis.

Die Unterschiede in der zentralen Beeinflussung der Atmung durch Serotonin bei Hund und Katze scheinen demnach darauf zu beruhen, daß die schon an sich hohe Aktivität des Inspirationszentrums der *Katze* durch Serotonin weniger leicht eine Steigerung erfährt als vielmehr durch Stimulierung des bulbär-inhibitorischen retikulären Systems eine

Hemmung, während die geringere Aktivität des Inspirationszentrums des *Hundes* durch Serotonin zunächst gesteigert wird (Hyperpnoe) und erst sekundär durch Erregung des inhibitorischen reticulären Systems sowie durch reziproke intrazentrale Hemmung eine Depression erfährt (sekundäre Apnoe).

Die *artspezifischen* Unterschiede zwischen Hund und Katze sind bei der *Ratte individuelle* Unterschiede, indem auf die gleiche Serotonindosis das eine Tier mit Hyperpnoe, das andere mit Apnoe reagieren kann.

Zusammenfassung

Vergleichende Untersuchungen an Hunden, Katzen, Meerschweinchen und Ratten über den Mechanismus der Serotoninwirkung auf die Atmung haben Anhaltspunkte dafür gegeben, daß die von Tierart zu Tierart verschiedene Wirkung durch eine verschiedene Reaktionslage und dadurch bedingte verschiedene pharmakologische Ansprechbarkeit der einzelnen an der Steuerung der Atmung beteiligten Mechanismen verursacht ist.

1. Beim *Meerschweinchen*, bei dem die Aktivität des Inspirationszentrums in besonders hohem Maße von vagal-afferenten Impulsen abhängt, führt Serotonin in einem weiten Dosierungsbereich zu reiner Hyperpnoe.

2. Bei der *Katze*, deren Inspirationszentrum eine von vagal-afferenten Impulsen weitgehend unabhängige, hohe Eigenaktivität besitzt, führt Serotonin in jeder überhaupt wirksamen Dosierung primär zu Apnoe.

3. Beim *Hund* verursacht Serotonin primär Hyperpnoe, an die sich sekundär eine Apnoe anschließt. Sehr kleine Serotonindosen (1 γ/kg) können zu reiner Apnoe führen.

4. Die *artspezifischen* Unterschiede zwischen Katze und Hund sind bei der *Ratte individuelle* Unterschiede, indem das eine Tier auf die gleiche Serotonindosis überwiegend hyperpnoisch, das andere Tier überwiegend apnoisch reagieren kann.

5. Die Versuchsergebnisse sprechen dafür, daß nach Serotonin auftretende *hyperpnoische* Reaktionen (Meerschweinchen, Hund, Ratte) bei niedriger Dosierung reflektorisch vom glomus aorticum, bei höherer Dosierung auch durch eine direkte Erregung des „Initiativzentrums" der Atmung ausgelöst werden; daß *apnoische* Reaktionen bei niedriger Dosierung durch eine Stimulierung intrapulmonaler Receptoren mit vagalen Afferenzen, bei höherer Dosierung auch zentral verursacht sind: durch eine Erregung des bulbär-inhibitorischen Systems der Formatio reticularis.

Literatur

Aviado, D. M., R. G. Pontius and C. F. Schmidt: J. Pharmacol. exper. Ther. **97**, 420 (1949).

Balzer, H., K. Greeff u. E. Westermann: Klin. Wschr. **1956**, 1204.

Bucher, K.: Pflügers Arch. ges. Physiol. **245**, 537 (1942).
Berry, J. U., J. F. Brailsford and J. de Burgh Daly: Proc. roy. Soc. B **109**, 214 (1932).
Churchill, E. D., and O. Cope: J. exp. Med. **49**, 531 (1929).
Comroe, J. H., B. van Lingen, R. C. Stroud and A. Roncoroni: Amer. J. Physiol. **173**, 379 (1953).
Douglas, W. W., and C. C. Toh: J. Physiol. (Lond.) **120**, 311 (1953).
Gangloff, H., u. M. Monnier: Helv. physiol. pharmacol. Acta **15**, 83 (1957).
Hering, E., u. J. Breuer: S.-B. Akad. Wiss. Wien, math.-nat. Kl. **57**, 677 (1868).
Heymans, C., u. G. van den Heuvel-Heymans: Arch. int. Pharmacodyn. **93**, 95 (1953).
Konzett, H., u. R. Rössler: Naunyn-Schmiedebergs Arch. exp. Path. Pharmak. **195**, 71 (1940).
Marckwald, E., Z. Biol. **23**, 149 (1887)
McCubbin, J. W., J. H. Green, G. C. Salmoiraghi and J. H. Page: J. Pharmacol. exp. Ther. **116**, 191 (1956).
Mott, J. C., and A. S. Paintal: Brit. J. Pharmacol. **8**, 238 (1953).
Oberholzer, R. J. H., u. H. Schlegel: Helv. physiol. pharmacol. Acta **15**, 63 (1957).
Reid, G., and M. Rand: Austr. J. exp. Biol. med. Sci. **29**, 401 (1951).
Schneider, J. A., and F. F. Jonkman: J. Pharmacol. exp. Ther. **111**, 84 (1954).
Shipley, R. E., and C. Wilson: Proc. Soc. exp. Biol. (N. Y.) **78**, 724 (1951).
Wyss, O. A. M.: Helv. physiol. pharmacol. Acta **12**, Suppl. X (1954).

Dr. E. Westermann, Pharmakologisches Institut der Universität Frankfurt a.M., Ludwig-Rehn-Straße 14

Arch. exper. Path. u. Pharmakol., Bd. 233, S. 531—540 (1958)

Aus dem Physiologischen Institut der Universität Heidelberg

Über die Acetylcholin-Empfindlichkeit verschiedener Herzabschnitte*

Von

ROBERT F. SCHMIDT

Mit 4 Textabbildungen

(Eingegangen am 15. Februar 1958)

Seit LOEWI die humorale Übertragung der Vaguswirkung (1921) und als Überträgerstoff das Acetylcholin (Ach) entdeckte (LOEWI u. NAVRATIL 1926), ist oft versucht worden, die Wirkungen des Ach auf die verschiedenen Herzabschnitte im einzelnen zu klären. Am Froschherzen zeigte LÁNCZOS (1930), daß die negativ inotrope Wirkung des Ach am Vorhof stärker ist als an der Kammerbasis und an dieser stärker als an der Kammerspitze. Dagegen fanden LISSÁK u. MARTIN (1940) keine unterschiedliche Empfindlichkeit innerhalb der Froschkammer und keine nennenswerte zwischen Kammer und Vorhof.

Am Vorhof des Warmblüters werden als Regelfall negativ inotrope (BURGEN u. TERROUX 1953), unter gewissen Bedingungen aber auch positiv inotrope Wirkungen des Ach auf die Muskulatur beschrieben (MCEWEN 1956). Keine Klarheit herrscht über die Effekte des Ach an der Kammermuskulatur des Warmblüters. Zuletzt haben MIDDLETON et al. (1956) am Papillarmuskel der Katze in Abhängigkeit von der Ach-Konzentration hemmende und fördernde Wirkungen gesehen.

Die Veränderungen des Ruhe- und Aktionspotentials durch Ach sind in neuerer Zeit mit intracellulärer Potentialabteilung (LING u. GERARD 1949) untersucht worden. Mit dieser Methode fanden DEL CASTILLO u. KATZ (1955a), HUTTER u. TRAUTWEIN (1955) am Froschherzen, BURGEN u. TERROUX (1953) am Vorhof der Katze eine Erhöhung des Ruhepotentials, sowie eine schnellere Repolarisation des Aktionspotentials (s. a. SCHÜTZ 1936). Ähnliche Ergebnisse beschrieben WEBB u. HOLLANDER (1956) am Rattenvorhof. An der Kammermuskulatur verändert Ach das Membranpotential nicht (HOFFMAN u. SUCKLING 1953).

Diese Befunde veranlaßten uns, die unterschiedliche Ach-Empfindlichkeit der verschiedenen Herzabschnitte vergleichend zu untersuchen, wobei wir am Froschherzen nur die Amplitude der Kontraktion, an den Warmblüterpräparaten gleichzeitig auch Ruhe- und Aktionspotential registrierten.

* Ausgeführt mit Unterstützung der Deutschen Forschungsgemeinschaft.

Methodik

Frosch. Neben Herzen an der Straubkanüle wurden hauptsächlich isolierte Vorhöfe und Streifenpräparate der Kammer untersucht (Rana esculanta, Präparation siehe Rothschuh 1948). Diese hingen in einer Meßkammer aus Plexiglas, die von O_2-gesättigter Lösung mit einer Geschwindigkeit von 0,2—0,8 cm/sec durchströmt wurde. Es wurde mit Rechteckimpulsen von 0,4—2 msec gereizt. Die Kontraktionen wurden mit einem Hebel auf ein Rußkymographion übertragen. Die Zusammensetzung der Ringer-Lösung war in mMol: Na 112,8; K 2,7; Ca 1,8; Cl 117,3; HCO_3 1,8. Die Raumtemperatur betrug 21°—24° C.

Ach (Ach-Chlorid der Firma Hoffmann-La Roche) wurde in Mengen von 0,001 γ—1,0 mg vor der Meßkammer in den die Ringer-Lösung zuführenden Schlauch gespritzt. Dabei verdünnt es sich in etwa 1 ml, der innerhalb von 1—5 sec am Präparat vorbeifließt.

Hund. Trabekel aus Vorhof und Kammerwand, Papillarmuskeln der Kammer und Purkinje-Fäden des Reizleitungssystems wurden aus noch schlagenden Herzen excidiert und in einer Meßkammer aus Plexiglas an einem Ende durch ein Zängchen fixiert, am anderen durch ein Haar mit der Anode der zur isometrischen Registrierung der Kontraktionsamplitude verwendeten transducer-Röhre (RCA 5734) verbunden. Alle Präparate wurden mit Rechteckimpulsen von 0,1 msec angetrieben. Die Meßkammer wurde von Tyrode-Lösung durchströmt (37° C), die mit einem Gasgemisch gesättigt war (95% O_2, 5% CO_2). Die Zusammensetzung der Tyrode-Lösung war in mMol: Na 153; K 2,7; Ca 1,8; Mg 1,05; Cl 145; HCO_3 13,5; H_2PO_4 2,4; Traubenzucker 5,2. Das Ach wurde wie oben geschildert appliziert.

Die Ableitung des Ruhe- und Aktionspotentials erfolgte mit Glascapillaren, die mit 3 Mol KCl-Lösung gefüllt waren. Ihr Spitzendurchmesser war nicht größer als 0,5 μ, der Widerstand betrug 30—60 MΩ. Das abgeleitete Potential wurde über einen Kathodenfolger durch den einen Strahl eines Cossor-Oscillographen registriert (weitere Einzelheiten siehe Dudel u. Trautwein 1954). Der zweite Strahl wurde zur Aufzeichnung der Kontraktionsamplitude verwendet.

Ergebnisse

Versuche am Froschherzen

Am Herzen an der Straubkanüle läßt sich die unterschiedliche Empfindlichkeit von Vorhof und Kammer nur schlecht untersuchen, da die Umgebung des Sinusknotens und der AV-Knoten schon durch sehr niedrige Ach-Konzentrationen (10^{-10} bis 10^{-12} g/ml) geblockt werden. Das Herz bleibt stehen, obwohl der Schrittmacher noch tätig ist, sichtbar an den schwankenden Lichtreflexen in der Sinusgegend. Der Vorhof wird aufgebläht und atonisch. In diesem Zustand bleiben Vorhof und Kammer erregbar: häufig lösen Kammereigenrhythmen oder ein partieller Block den Stillstand ab (Abb. 1). Elektrische Reizung führt immer zu Kontraktionen; erst bei Ach-Konzentrationen von mehr als 10^{-4} g/ml kann an der Kammer kein Reizerfolg mehr registriert werden. Chronotrope Effekte treten nie vor dem Block auf, so daß die Frequenzminderung nur am Sinus mit der Lupe festgestellt werden kann. Wegen dieser unübersichtlichen Verhältnisse am ganzen Herzen sind zum Studium der inotropen Effekte des Ach isolierte Präparate von Vorhof und Kammer besser geeignet.

Abb. 2*A* zeigt die Ach-Wirkung an einem spontan schlagenden isolierten Sinus-Vorhof-Präparat; 0,1 γ bringt einen Stillstand für etwa eine Minute, obwohl das Ach nur wenige Sekunden am Präparat vorbeifloß. Ein Sinus-Vorhofblock hat die Tätigkeit des Präparates unterbunden. Wird es dagegen elektrisch gereizt, so kommt es weder bei der gleichen (0,1 γ), noch bei der 10fach größeren Dosis zu einem Stillstand (Abb. 2, *C* und *D*). Kleine Mengen Ach, die noch nicht zu einem Block führen, wirken am spontan schlagenden und am elektrisch gereizten Präparat gleich stark negativ inotrop.

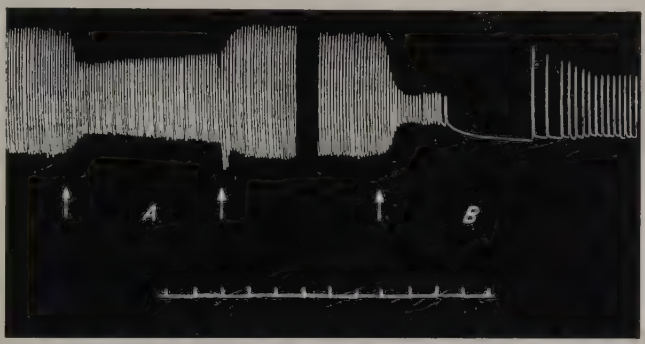


Abb. 1. Spontan schlagendes Herz an der Straubkanüle, Kontraktion registriert mit Hebel auf Rußkymograph. *A*: zwischen den Pfeilen Ersatz der Ringer-Lösung durch Ach 10^{-13} g/ml in Ringer, minimal wirksame Konzentration. 10^{-14} g/ml Ach wirkt nicht. *B*: 5 min später nach 3maligem Wechsel der Ringer-Lösung bei Pfeil Ach 10^{-12} g/ml in Ringer. Zeitmarken alle 15 sec. Versuch vom 23. 1. 1957

Der isolierte gereizte Kammerstreifen ist gegen Ach 10—100fach unempfindlicher als das Vorhofpräparat (Abb. 2, *E*—*G*). Unerregbarkeit des Präparates war auch nach 1 mg Ach nicht zu erzielen. Wurden die Versuche in nicht zirkulierender Badelösung durchgeführt, so prägte sich der Unterschied zwischen Vorhof und Kammer noch stärker aus. Die minimal wirksame Konzentration, die eine negative Inotropie hervorrief, lag beim Vorhofpräparat regelmäßig bei 10^{-12}, beim Kammerstreifen bei 10^{-9} bis 10^{-8} g/ml.

Beim Vergleich der wirksamen Konzentrationen an Vorhof und Kammer (z. B. Abb. 2, *C* u. *D* mit Abb. 2, *E* u. *F*) ist zu bedenken, daß die Kammerwand etwas dicker als die des Vorhofs ist. Der durch Diffusion und Spaltung verursachte Diffusionsgradient könnte im Inneren der dickeren Präparate zu relativ geringerer Ach-Konzentration führen, ein solches Präparat scheint dann weniger empfindlich. Die Diffusions- und Spaltungsverhältnisse sind nicht zu übersehen. In der äußersten Schicht herrscht jedoch unabhängig von der Dicke fast die Außenkonzentration. Bei der minimal wirksamen Konzentration wird nur die Kontraktion der äußersten Schichten vermindert werden, diese Konzentrationen lassen sich also vergleichen. Es ist aber durchaus möglich, daß in Abb. 2, *E* bei einem dünneren Präparat die Hemmung etwas ausgeprägter wäre.

Die beschriebenen Befunde decken sich nur teilweise mit dem von Lissák u. Martin (1940), die zwischen isoliertem Vorhof und

„Kammersegment" nur einen Unterschied von ungefähr einer Zehnerpotenz beschrieben haben. Ebenso wie sie, im Gegensatz zu Lánczos (1930), fanden wir keine verschiedene Empfindlichkeit des Streifens der Kammerbasis und der Kammerspitze. Allerdings wurden die Befunde von Lánczos am Straubherzen mit Hilfe von Ligaturen erhoben. Es ist möglich, daß bei dieser Methode die Ausgangsbedingungen so stark verändert wurden, daß der beschriebene Effekt entstand.

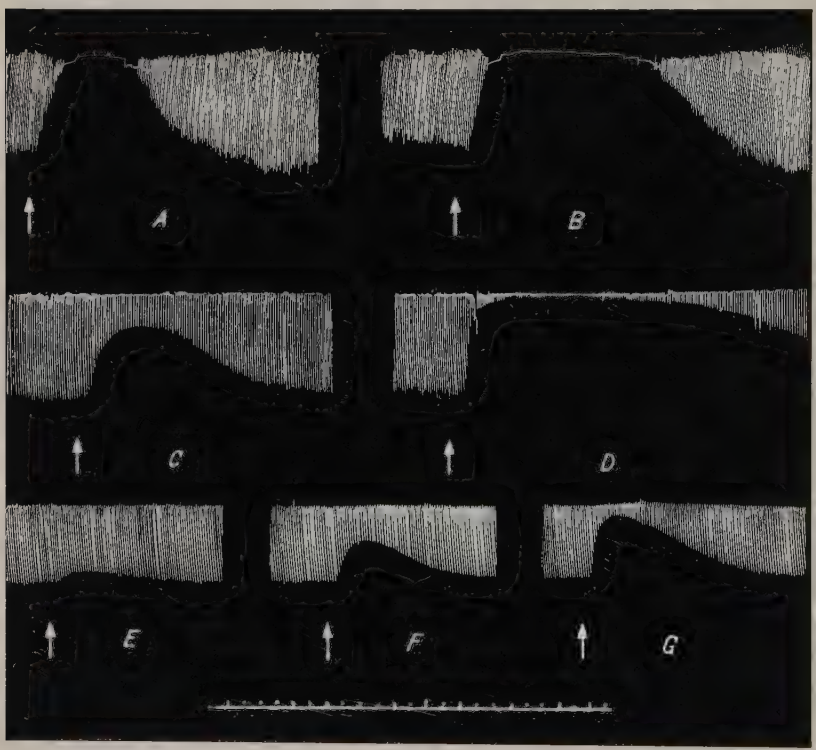


Abb. 2. Die Wirkung von Ach auf den spontan schlagenden (*A* u. *B*) und den elektrisch gereizten Vorhof (*C* u. *D*), sowie den gereizten Kammerstreifen (*E*—*G*) des gleichen Herzens. Präparate in durchströmter Meßkammer, Strömungsgeschwindigkeit der Ringer-Lösung 0,4 cm/sec. Bei *A*, *C*, *E* jeweils Injektion von 0,1 γ Ach, bei *B*, *D*, *F* 1,0 γ Ach und bei *G* 10 γ Ach. Zeitmarken alle 15 sec. Versuch vom 12. 2. 1957

Versuche am Myokard des Hundes

Die Versuche am Froschherzen ließen erwarten, daß auch die verschiedenen Abschnitte des Warmblüterherzens gegenüber Ach verschiedene Empfindlichkeit besitzen. Um neben der inotropen Wirkung des Ach auch seinen Einfluß auf die die Erregung auslösenden Vorgänge zu beobachten, registrierten wir bei den folgenden Versuchen neben der isometrischen Kontraktion auch das Ruhe- und Aktionspotential.

1. Vorhofmyokard. In Abb. 3 sind die gesamten Meßergebnisse nach einer Ach-Gabe dargestellt. Nach Injektion von 1 γ Ach in die Zirkulation einige Zentimeter vor dem elektrisch gereizten Präparat erhöht sich das Ruhepotential um etwa 30 mV [Gaskell-Effekt (1886), siehe auch DEL CASTILLO u. KATZ (1955a), HUTTER u. TRAUTWEIN (1955)]. Eine solch starke Hyperpolarisation findet sich nur bei Fasern mit relativ niedrigem Ruhepotential (TRAUTWEIN u. DUDEL 1958a). Als Folge des erhöhten Ruhepotentials wird das Aktionspotential ebenfalls größer (WEIDMANN 1956). Das Aktionspotential verkürzt sich von 155 msec auf minimal 43 msec, d. h. auf fast ein Viertel des Ausgangswertes. Die Änderungen der Kontraktionskraft folgen mit kleiner Latenz, halten aber länger an: wenn die Dauer des Aktionspotentials sich wieder normalisiert hat, erreicht die Kontraktion erst 40% des anfänglichen Wertes. Bei über 20 Trabekeln aus 5 Herzen war keine unterschiedliche Empfindlichkeit des rechten und linken Vorhofs festzustellen. Die minimal wirksame Konzentration lag zwischen 0,001 γ bis 0,005 γ Ach. Auffallend war, daß bei Erhöhung der Dosis die Kontraktion rasch weiter abnahm. Bei Injektion von 0,1 γ Ach nahm die Kontraktionskraft immer auf weniger als 20% des Ausgangswertes ab. Das Aktionspotential verkürzt sich dabei erst um etwa 50%. Wesentlich höhere Konzentrationen (s. Abb. 3) bringen nur noch unwesentliche weitere Abnahme der Kontraktion, während sich die Dauer des Aktionspotentials weiter vermindert.

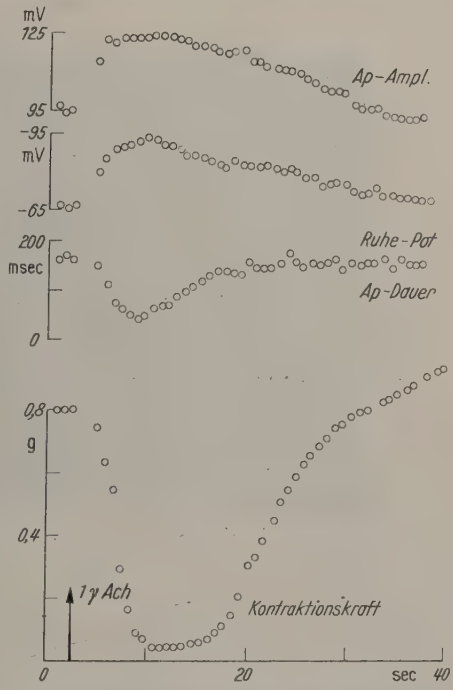


Abb. 3. Elektrisch getriebener Trabekel des rechten Hundevorhofes. Wirkung von 1 γ Ach auf Ruhepotential, Amplitude und Dauer des Aktionspotentials (konstanter Einstich) und isometrische Kontraktion. Meßbedingungen wie in Abb. 4. Dauer des Aktionspotentials: Zeit vom Beginn des Aufstrichs bis zur Repolarisation auf 10%

2. Kammermyokard. Am Kammermyokard in situ, sowie am excidierten Papillarmuskel des Hundes fanden HOFFMAN u. SUCKLING (1953) durch Vagusreizung oder Ach in Konzentrationen bis zu 10^{-4} g/ml keine Veränderung des Ruhe- und Aktionspotentials. Wir können diese Befunde bestätigen. Keines der 6 Präparate aus 3 Herzen zeigte eine

meßbare Veränderung des Ruhe- und Aktionspotentials bei Injektion von 0,01 γ bis 1 mg Ach.

Die Amplitude der Kontraktion wurde dagegen durch große Gaben Ach regelmäßig um 10—40% vermindert (Abb. 4). Die minimal wirksame Dosis war dabei einmal 10γ, sonst 100—150γ Ach. Nach der Abnahme der Kontraktionskraft folgte jedesmal eine Zunahme über den anfänglichen Wert. Bei einem 8 Std alten Präparat wurde sogar nur noch diese Erhöhung gefunden.

Diese Phase positiver Inotropie wurde auch bei allen Vorhofpräparaten gesehen. Ihre Dauer schwankte zwischen 30 sec und mehreren

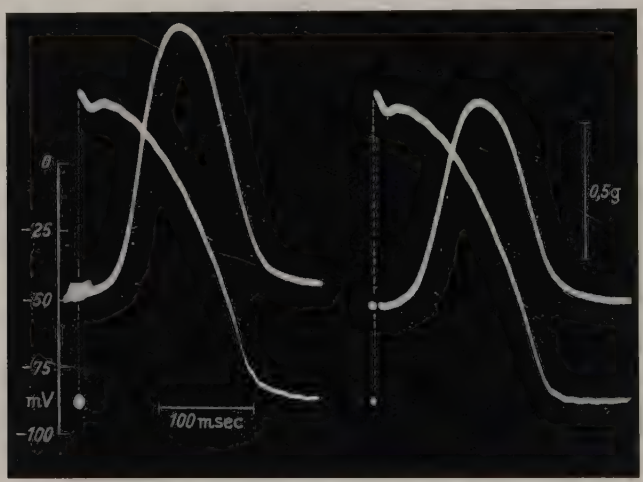


Abb. 4. Aktionspotential und isometrische Kontraktion eines Papillarmuskels aus der rechten Kammer des Hundes. Präparat liegt in Tyrode-durchströmter (0,5 cm/sec) Meßkammer. *A* vor, *B* maximaler Effekt nach der Applikation von 150 γ Ach. Aufstrich der Aktionspotentiale nachträglich gestrichelt eingezeichnet

Minuten, die Kontraktion erreichte zwischen 110 und 150% (durchschnittlich 128%) des ursprünglichen Wertes. In der Reaktion der Abb. 4 z. B. dauerte sie von der 45. bis zur 90. sec nach Ach-Injektion. Dabei erreichte die Kontraktion 133% des Ausgangswertes. Es fanden sich keine eindeutigen Korrelationen zwischen der Menge des Ach, der Stärke der negativen Inotropie und deren Dauer einerseits und der Dauer und Größe dieses Überschießens andererseits. Auch zeigten die verschiedenen Herzabschnitte kein deutlich unterschiedliches Verhalten. Am Frosch war dieser Effekt selten. Wenn er auftrat, so fiel auf, daß er mit fortschreitender Versuchsdauer sich stärker ausprägte.

3. Purkinje-Fäden des Reizleitungssystems. Am spontan schlagenden Purkinje-Faden kann Ach die Frequenz herabsetzen. Nach 100 γ Ach nahm in 3 Präparaten die Frequenz auf wenigstens ein Drittel des Ausgangswertes ab, die minimal wirksame Konzentration lag bei 0,1 γ Ach. Das maximale diastolische Potential erhöht sich dabei nicht sichtbar. Die

Dauer des Aktionspotentials — gemessen bei durch Reiz konstant gehaltener Frequenz — verkürzt sich nach 100 γ Ach um etwa 10%. Diese Ach-Wirkungen am Purkinje-Faden sind nicht konstant: an 2 weiteren Präparaten änderte sich auf Ach selbst die Spontanfrequenz nicht. Entgegen der Darstellung von Trautwein (1957) wirkt Ach also zumindest bei einem Teil der Purkinje-Fäden. Bei der schwachen Reaktion der Purkinje-Fäden wird deutlich, daß von den Erregungsvorgängen die spontane diastolische Depolarisation auf Ach am empfindlichsten reagiert (s. auch Trautwein u. Dudel 1958b).

Diskussion

Nach den erhobenen Befunden reagiert das ganze Froschherz auf Ach wesentlich empfindlicher als das isolierte gereizte Kammermyokard. Eine negative Inotropie der Kammermyokardfaser kann daher, entgegen der bisherigen Interpretation, nicht die hauptsächlichste Ursache der verminderten Kontraktion des Herzens an der Straub-Kanüle bei niedrigen Ach-Konzentrationen sein. Eine negative Inotropie der Vorhoffasern, die bei diesen Konzentrationen möglich ist, reicht ebenfalls zur Erklärung der Kontraktionsabnahme nicht aus, da die Vorhöfe an der Kontraktion einen sehr geringen Anteil haben. Es müssen vielmehr die die Kontraktion auslösenden Vorgänge durch das Ach so beeinflußt werden, daß es zur Kontraktionsabnahme kommt. So führt z. B. eine teilweise Unterdrückung der Reizleitung zu einer schwächeren Kontraktion, da die Zahl der erregten Fasern abnimmt. Wahrscheinlich wird auf diese Weise die Kontraktion am Straubherzen bei niedrigen Ach-Konzentrationen vermindert, da wir fanden, daß die Kontraktion meist sprunghaft abnimmt und der Stillstand des Herzens bei höheren Konzentrationen durch vollkommene Unterdrückung der Reizleitung zustande kommt. Durch die gleichzeitige Messung des Ruhe- und Aktionspotentials läßt sich dieser Einfluß der Reizleitung auf die Kontraktion noch besser verfolgen: Vagusreiz führt am Vorhof zu abortiven Aktionspotentialen in der Sinusgegend, die nicht oder nur schlecht geleitet werden (Hutter u. Trautwein 1956). Bei dieser Verknüpfung der kontraktionsauslösenden Vorgänge mit der Kontraktion des ganzen Herzens stellt sich die Frage, ob es auch an der Einzelfaser unter Ach eine Kopplung zwischen der Form des Aktionspotentials und der Kontraktion gibt.

Burgen u. Terroux (1953) nahmen einen solchen Zusammenhang an: sie waren der Ansicht, daß die verminderte Kontraktion unter Ach durch das verkürzte Aktionspotential verursacht sei. Unser Befund, Abnahme der Kontraktion des Papillarmuskels bei relativ großen Ach-Dosen ohne Veränderung des Ruhe- und Aktionspotentials, läßt eine solche Annahme zweifelhaft erscheinen. Der gleiche Befund widerlegt auch die Ansicht von Hoffman u. Suckling (1953), daß die fehlende

Ach-Empfindlichkeit der Kammermyokardmembran durch eine Impermeabilität der Membran für Ach bedingt sei. Vielmehr muß es sich um ein Fehlen jener spezifischen Ach-Receptoren (del Castillo u. Katz 1955b) der Membran handeln, die z. B. am Vorhof die Kalium-Permeabilität erhöhen. Eine enge Kopplung der Aktionspotentialdauer und der Kontraktion wird auch dadurch unwahrscheinlich, daß der Phase positiver Inotropie, die bei unseren Versuchen auf die negative folgt, keine Veränderung des Ruhe- und Aktionspotentials an Vorhof und Kammer entspricht.

Bisher sind diese Phasen positiver Inotropie durch Ach nur ohne vorhergehende negative oder unter dem Einfluß von Pharmaka, insbesondere Atropin, beschrieben worden (Middleton et al. 1956). Ohne Einfluß von Pharmaka erreichte McEwen (1956) am Rattenvorhof durch kurzfristige Vagusreizung eine zweiphasisch verlaufende Inotropie, verbunden mit Frequenzsteigerungen in der positiven Phase. Er vermutet mit Jourdan u. Nowak (1936), Kabat (1939) und Middleton et al. (1949) Acceleransfasern in den Nn. vagi. Da wir aber auch nach Ach positive Inotropie finden, liegt es nahe anzunehmen, daß der Effekt durch Freisetzung von Adrenalin aus cholinergen Ganglien verursacht wird. Allerdings haben Middleton et al. (1956) in Katzenpapillarmuskeln, die positive Inotropie zeigten, bei anschließender histologischer Untersuchung kein chromaffines Gewebe gefunden. Eine andere Erklärungsmöglichkeit bietet die Erhöhung des Ruhepotentials nach Ach durch die erhöhte Kalium-Leitfähigkeit (Trautwein u. Dudel 1958a): Fasern, die durch niedriges Ruhepotential unerregbar geworden sind, können durch die Hyperpolarisation unter Ach wieder erregbar werden und anschließend die Inotropie verstärken. Solche „erregende" Wirkungen des Ach sind auch von Burn u. Vane (1949), Marshall u. Vaugham Williams (1956) und Trautwein u. Dudel (1958b) (frühere Literatur siehe Rothschuh 1954) beschrieben worden.

Gegen diesen Mechanismus spricht, daß wir die Phase positiver Inotropie an allen Präparaten finden, auch den frisch excidierten und besonders am Papillarmuskel, dessen Ruhepotential durch Ach nicht hyperpolarisiert wird. Es bliebe also zu prüfen, ob nicht Ach an der Herzmuskelfaser nach der negativen eine „echte" positive Inotropie bewirkt, die aber nur nach kurzfristiger Ach-Applikation auftritt. Mit den vorliegenden Versuchen läßt sich diese Frage nicht endgültig entscheiden.

Zusammenfassung

An Präparaten verschiedener Herzabschnitte des Frosch- und Hundeherzens wurde die Ach-Wirkung auf die Kontraktion und das Membranpotential untersucht. Dabei fanden wir:

1. Die minimal wirksame Konzentration lag beim ganzen Froschherzen bei 10^{-14} bis 10^{-12}, bei den isolierten Vorhöfen bei 10^{-12} und beim Kammerstreifen bei 10^{-9} bis 10^{-8} g/ml Ach.

2. Bei 10fach höherer als der minimal wirksamen Konzentration bleiben das isolierte Froschherz und das isolierte Sinus-Vorhof-Präparat regelmäßig durch Reizleitungsblock stehen.

3. Am Vorhoftrabekel des Hundes treten gleichzeitig mit der negativen Inotropie Hyperpolarisation des Ruhe- und Verkürzung des Aktionspotentials auf. Am Papillarmuskel wird die Kontraktion erst durch 10^4 bis 10^5fach höhere Konzentration vermindert, ohne daß sich Ruhe- und Aktionspotential ändern.

4. Bei allen Warmblüterpräparaten ist die negative Inotropie von einer Phase positiver Inotropie gefolgt. Diese dauert 30 sec bis mehrere Minuten, die Kontraktion erreicht dabei 110—150% des Ausgangswertes.

Herrn Dozent Dr. Trautwein danke ich herzlich für die Themenstellung, seine Unterstützung und die Überlassung des Versuchsstandes.

Literatur

Burgen, A. S. V., and K. G. Terroux: On the negativ inotropic effect in the cat's auricle. J. Physiol. (Lond.) **120**, 449—464 (1953).

Burn, J. H., and J. R. Vane: The relation between the motor and the inhibitor action of acetylcholine. J. Physiol. (Lond.) **108**, 104—115 (1949).

del Castillo, J., and B. Katz: The membrane potential changes in the frog's heart produced by inhibitory nerve impulses. Nature (Lond.) **175**, 1035 (1955a).

del Castillo, J., and B. Katz: On the localization of acetylcholine receptors. J. Physiol. (Lond.) **128**, 157—181 (1955b).

Dudel, J., u. W. Trautwein: Das Aktionspotential und Mechanogramm des Herzmuskels unter dem Einfluß der Dehnung. Cardiologia (Basel) **25**, 344—362, (1954).

Gaskell, W. H.: The electrical changes in the quiescent cardiac muscle which accompany stimulation of the vagus nerve. J. Physiol. (Lond.) **7**, 451—452 (1886).

Hoffman, B. F., and E. E. Suckling: Cardiac cellular potentials: effect of vagal stimulation and acetylcholine. Amer. J. Physiol. **173**, 312—320 (1953).

Hutter, O. F., and W. Trautwein: Effect of vagal stimulation on the sinus venosus of the frog's heart. Nature (Lond.) **176**, 512 (1955).

Hutter, O. F., and W. Trautwein: Vagal and sympathetic effects on the pacemaker fibers in the sinus venosus of the heart. J. gen. Physiol. **39**, 715—733 (1956).

Jourdan, F., and S. J. C. Nowak: Étude expérimental chez le chien des fibres cardio-accélératrices du vague. Arch. int. Pharmacodyn. **53**, 121—135 (1936).

Kabat, M.: The cardiac accelerator fibers in the vagus nerve of the dog. Amer. J. Physiol. **128**, 246—257 (1939).

Lánczos, A.: Über die Wirkung des Vagusstoffes und Acetylcholins auf die isolierte Kammer des Froschherzens. Pflüg. Arch. ges. Physiol. **225**, 710—720 (1930).

Ling, G., and R. W. Gerard: The normal membrane potential of frog sartorius fibers. J. cell. comp. Physiol. **34**, 383—396 (1949).

Lissák, K., u. J. Martin: Beiträge zum Wirkungsmechanismus des Atropins. Naunyn-Schmiedeberg's Arch. exp. Path. Pharmak. **196**, 558—565 (1940).

Loewi, O.: Über humorale Übertragbarkeit der Herznervenwirkung. I. Mittlg. Pflüg. Arch. ges. Physiol. **189**, 239—242 (1921).

Loewi, O., u. E. Navratil: Über humorale Übertragbarkeit der Herznervenwirkung. X. Mittlg. Über das Schicksal des Vagusstoffes. Pflüg. Arch. ges. Physiol. **214**, 678—688 (1926).

McEwen, L. M.: The effect on the isolated rabbit heart of vagal stimulation and its modification by cocaine, hexamethonium and ouabaine. J. Physiol. (Lond.) **131**, 678—689 (1956).

Marshall, J. M., and E. M. Vaugham Williams: Pacemaker potentials. The excitation of isolated rabbit auricles by Acetylcholine at low temperatures. J. Physiol. (Lond.) **131**, 186—199 (1956).

Middleton, S., H. H. Middleton and J. Toha: Adrenergic mechanism of vagal cardio-stimulation. Amer. J. Physiol. **158**, 31—37 (1949).

Middleton, S., C. Oberti, R. Prager and H. H. Middleton: Stimulation effect of acetylcholine on the papillary myocardium. Acta physiol. lat.-amer. **6**, 82—89 (1956).

Rothschuh, K. E.: Über die Anwendbarkeit der Differenzanalyse und der Vektoranalyse auf das indirekt abgeleitete Elektrocardiogramm. Arch. Kreisl.-Forsch. **14**, 155—204 (1948).

Rothschuh, K. E.: Vorkommen und Funktionen des Acetylcholins im Herzen. Klin. Wschr. **32**, 1—7 (1954).

Schütz, E.: Elektrophysiologie des Herzens bei einphasischer Ableitung. Ergebn. Physiol. **38**, 493—620 (1936).

Trautwein, W.: in K. Spang, Rhythmusstörungen des Herzens, S. 65. Stuttgart: Georg Thieme 1957.

Trautwein, W., u. J. Dudel: Zum Mechanismus der Membranwirkung des Acetylcholin an der Herzmuskelfaser. Pflüg. Arch. ges. Physiol. **266**, 324—334 (1958a).

Trautwein, W., u. J. Dudel: Hemmende und „erregende" Wirkungen des Acetylcholin am Warmblüterherzen. Zur Frage der spontanen Erregungsbildung. Pflüg. Arch. ges. Physiol. **266**, 653—664 (1958b).

Webb, J. L., and P. B. Hollander: The action of acetylcholin and epinephrine on the cellular membrane potentials and contractility of rat atrium. Circulat. Res. **4**, 332—336 (1956).

Weidmann, S.: Elektrophysiologie der Herzmuskelfaser. Bern, Stuttgart: Hans Huber 1956.

Robert F. Schmidt, Physiologisches Institut der Universität Heidelberg, Akademiestr. 3

Arch. exper. Path. u. Pharmakol., Bd. 233, S. 541—549 (1958)

Aus dem Pharmakologischen Institut der Universität Heidelberg
(Direktor: Prof. Dr. F. Eichholtz)

Die renale Sulfatausscheidung bei Katzen und Hunden nach Versuchen mit anorganischem Sulfat und Phenylsulfat

Von
J. Gillissen, H. Hochrein, H. Meissdörfer und R. Taugner

Mit 3 Textabbildungen

(Eingegangen am 1. März 1958)

Die Nierenausscheidung einer Anzahl von Stoffen läuft nach ihrer Koppelung an Essigsäure, Glukuronsäure oder Phosphorsäure beschleunigt ab (Terp; Braun u. Lotspeich; Braun, v. Bubnoff u. Taugner; vgl. auch H. W. Smith). Dieser Befund ist im allgemeinen durch eine zusätzliche tubuläre Ausscheidung des Kopplungsproduktes erklärt worden, während die freien Paarlinge nur filtriert (und rückresorbiert) werden sollen. Nach Sperber kommt bei Hühnern und Ziegen auch eine tubuläre Ausscheidung von Phenolschwefelsäureestern vor. Die mögliche Bedeutung dieses zusätzlichen Ausscheidungsweges für die Entgiftung von Phenolen veranlaßte uns, die renale Ausscheidung von Phenylsulfat im Vergleich zu der von anorganischem Sulfat auch an Katzen und Hunden zu prüfen.

Anorganisches Sulfat wird beim Hund nur filtriert und rückresorbiert, aber nicht tubulär ausgeschieden. Nach den maßgeblichen Untersuchungen von Lotspeich soll diese Rückresorption durch ein tubuläres Maximum charakterisiert sein, das schon bei sehr niedrigen Plasmakonzentrationen erreicht wird (vgl. Goudsmit, Power u. Bollmann). Für die Katze lagen derartige Untersuchungen mit anorganischem Sulfat nicht vor. Sie mußten daher zum Vergleich mit der Estersulfatausscheidung erst nachgeholt werden.

Versuchsanordnung

Katzen (1,5—3,5 kg) und Hunde (18—20 kg) wurden mit Urethan-Chloralose (250 bzw. 60 mg/kg subcutan) narkotisiert. Harnentnahmen erfolgten durch spezielle Glaskanülen aus der eröffneten Blase (vgl. Schmid, Ganz, Braun u. Taugner). Zur Infusion wurde eine Femoralvene, zur Blutentnahme eine Carotis freigelegt. Die Tiere erhielten mit der Narkose 50 ml Wasser per Schlundsonde. Vor Beginn der Clearanceperioden wurde zunächst 20—30 min lang physiologische Kochsalzlösung, dann für 20 min die erste Sulfatlösung mit 0,6% Kreatinin infundiert. Ein „Vorlauf" von 20 min ohne Clearancebestimmungen wurde außerdem bei jedem Wechsel der infundierten Sulfatmenge eingeschaltet. Die Lösungen

enthielten 5—60 g Na_2SO_4 bzw. 7,5—85 g $C_6H_5SO_4Na$ pro Liter[1]. Die Infusionsgeschwindigkeit betrug 1,5 ml/min. Bei den einzelnen Sulfatlösungen wurden gewöhnlich 3 Clearanceperioden zu je 10 min abgewartet. Die Blutentnahmen erfolgten in der Mitte der 1. u. 3. Periode. In einigen Versuchen erzeugten wir — nach 3 Kontrollperioden mit Natriumsulfat — eine starke Mannit-Diurese. Hierzu wurden 1,5 g/kg i.v. injiziert und anschließend auch noch 0,3 g Mannit pro Kilogramm Körpergewicht und Minute infundiert.

Filtriertes und rückresorbiertes Sulfat wurden wie üblich an Hand der Filtrationsbestimmung mit Kreatinin errechnet. Die Kreatininbestimmungen erfolgten nach Lieb u. Zacherl, die Sulfatbestimmungen nach Power u. Wakefield. Die Zahlenwerte für organisches und anorganisches Sulfat bezeichnen *die jeweiligen S- und nicht etwa SO_4-Mengen bzw. Konzentrationen.* Die Fehlerbreite betrug bei den Kreatininanalysen $\pm$ 2%, bei der Bestimmung von anorganischem Sulfat $\pm$ 3% und beim Gesamtsulfat $\pm$ 6%. Das organische Sulfat ergab sich aus der Differenz zwischen Gesamtsulfat und anorganischem Sulfat. Zur Gerinnungsverhütung diente das seit langem bewährte Thrombocid[2].

Versuchsergebnisse

1. Die Sulfatausscheidung der Katze bei Infusion von Natriumsulfat. Abb. 1 gibt die Sulfat*rückresorption* der Katze in Abhängigkeit vom anorganischen Sulfatspiegel im Blutplasma wieder. Aus dem Abstand der einzelnen Symbole von der Hinweislinie V, die vollständige Rückresorption anzeigt, kann für die einzelnen Clearanceperioden aber auch das Ausmaß der Sulfat*ausscheidung* abgeschätzt werden. Ohne Sulfatinfusion lag die Konzentration von anorganischem Sulfat im Blutplasma meist zwischen 1,2 und 1,7, bei einer Katze bei 2,8 mg-%. In diesem Bereich wurden im allgemeinen 80—90%, in einem Fall allerdings nur etwa 50% der filtrierten Sulfatmenge rückresorbiert. Bei Plasmakonzentrationen über 3 mg-% nimmt die Rückresorption entsprechend Abb. 1 im Verhältnis zur Sulfatausscheidung etwas ab; bei rund 10 mg-% stellt sich dann ein annähernd konstantes Verhältnis zwischen Ausscheidung und Rückresorption ein. Die absoluten Rückresorptionswerte steigen dagegen auch von hier ab fortlaufend, wenn auch etwas flacher, mit dem Plasmaspiegel an: Die Sulfatrückresorption erreicht zwischen 50 und 70 mg-% sogar Werte von 30—40 mg/100 ml Glomerulumfiltrat. Bei der Katze ist demnach — im Gegensatz zu den Verhältnissen beim Hund — selbst im Bereich höchster Plasmakonzentrationen kein tubuläres Maximum der Sulfatrückresorption zu erkennen.

Diese Speciesunterschiede spiegeln sich auch im Verhältnis Sulfatclearance/Filtrationsgröße wieder. Während die Sulfatclearance des

[1] Die Herstellung des phenylsulfonsauren Na verdanken wir der Freundlichkeit von Herrn Dr. Drawert, Chemische Abteilung des Max-Planck-Institutes für Medizinische Forschung in Heidelberg.

[2] Der Firma Dr. W. Benend, München-Solln, sei hier nochmals für die Überlassung des Präparates gedankt.

Hundes sich — wie bei anderen Harnbestandteilen mit beschränkter Rückresorption — asymptotisch der Kreatininclearance nähert (Lotspeich), steigt die Sulfatclearance der Katze nur bis zur Hälfte der Kreatininclearance an (Abb. 2).

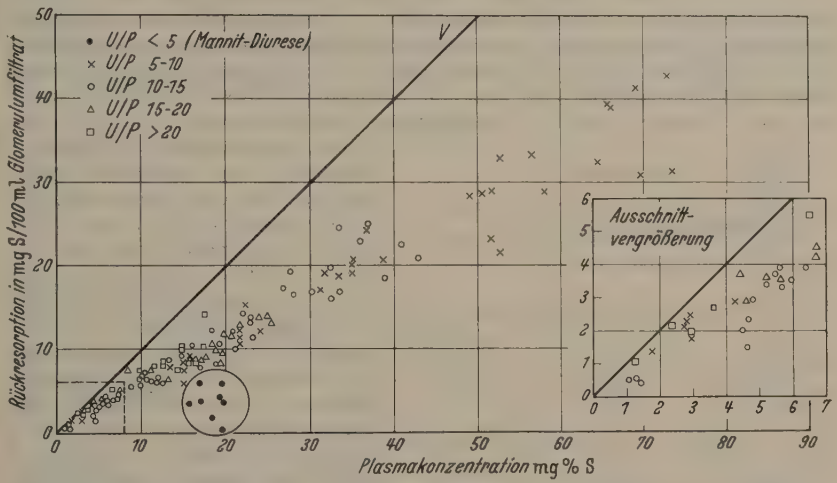


Abb. 1. Sulfatrückresorption bei steigender Plasmakonzentration. Nähere Erläuterung im Text

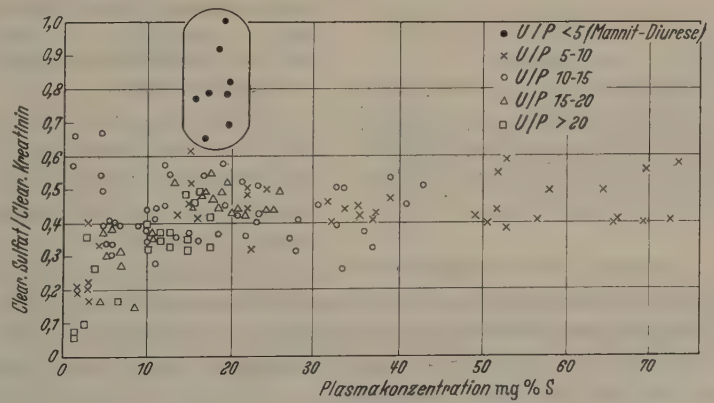


Abb. 2. Verhältnis Sulfatclearance zu Kreatininclearance bei steigender Sulfatkonzentration im Blutplasma. Nähere Erläuterung im Text

Die Streuung der an 13 Tieren gewonnenen Ergebnisse in Abb. 1 und 2 beruht zum Teil ohne Zweifel auf individuellen Unterschieden. Aus Tab. 1 geht hervor, daß die an einer Katze gewonnenen Werte tatsächlich besser zusammenliegen können. Daneben dürften aber auch Narkoseeinflüsse und Analysenfehler an den Streuungen beteiligt sein. Auf Grund späterer Erfahrungen mit Vitamin C, Glykokoll und Alanin schien außerdem ein Zusammenhang zwischen Sulfatrückresorption und Diurese möglich (vgl. Goudsmit, Power u. Bollmann; Schou).

Zum Vergleich der Ergebnisse an verschiedenen Tieren dient als Maßstab für die Diurese am besten das Verhältnis der Kreatininkonzentrationen in Urin und Plasma, der sogenannte U/P-Wert (Shannon). Aufschlüsselung der gesamten Ergebnisse nach den verschiedenen U/P-Werten ergab jedoch keine deutliche Abhängigkeit der Sulfatausscheidung bzw. Sulfatrückresorption von der Diurese (Abb. 1 u. 2). Dadurch waren jedoch nur größere diureseabhängige Schwankungen der Rückresorption in einem beschränkten U/P-Bereich zwischen 8—30 ausgeschlossen. In diesen ersten, mit anderer Zielsetzung durchgeführten Versuchen variierte außerdem neben der Diurese meist auch die Plasmakonzentration, so daß eventuelle Diureseeinflüsse auch innerhalb der einzelnen Experimente nicht zuverlässig beurteilt werden konnten. Es kommt hinzu, daß die anfängliche Wasserdiurese durch die nachfolgende Sulfatinfusion allmählich in eine osmotische Diurese überging; auch dies könnte den Einfluß der osmotischen Diurese auf die Sulfatrückresorption verschleiern (vgl. Shannon; Taugner u. Gillissen).

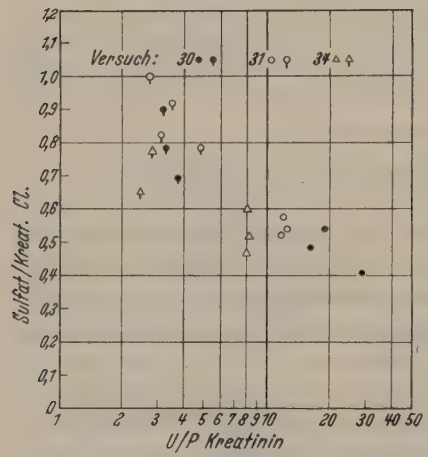


Abb. 3. Zusammenhang zwischen Sulfatausscheidung und Diurese bei starker osmotischer Belastung. Werte während der Mannit-Infusion durch vertikalen Strich gekennzeichnet. Die Sulfatkonzentrationen im Plasma lagen in den wiedergegebenen 3 Versuchen zwischen 16,8 und 19,35; 16,8 und 19,8 bzw. 15,0 und 16,85 mg-%

In besonderen Versuchen wurden daher stabile Sulfatspiegel eingestellt und die U/P-Werte von Kreatinin nach 3 Kontrollperioden durch hohe Mannitgaben auf 2,4—5 erniedrigt. Bei Plasmakonzentrationen unter 15mg-% war aber auch dabei — wie ganz allgemein bei geringerer Diuresesteigerung — keine sichere Beeinträchtigung der Sulfatrückresorption zu beobachten. In drei Versuchen mit konstanten Sulfatspiegeln über 15 mg-% führte die Mannit-Diurese schließlich zu deutlichen Effekten.

Gleichzeitig mit der extremen Verminderung des U/P-Wertes für Kreatinin erfolgt eine Annäherung der Sulfatclearance an die Clearance von Kreatinin (Abb. 2, eigens gekennzeichnete Werte, und Abb. 3). Ursache dieses Verhaltens ist eine deutliche Abnahme der Sulfatrückresorption während der osmotischen Belastung (Abb. 1, gekennzeichnete Werte). Nach diesen Ergebnissen scheint es nicht ausgeschlossen, daß geringere Effekte ähnlicher Art auch unter weniger extremen Bedingungen vorkommen und an der Streuung der Rückresorptionswerte beteiligt sind.

In Abb. 3 sind nur Clearanceperioden mit konstanter oder steigender Diurese eingetragen. Fiel die Diurese 40—50 min nach der Mannit-Injektion trotz fortlaufender Infusion oder nach Absetzen der Mannit-Infusion ab, so kam es meist zu einer weiteren, exzessiven Erhöhung der Sulfatclearance. Diese übertraf die Kreatininclearance in einem Versuch sogar um den Faktor 1,3. Shannon beobachtete an Hunden umgekehrt bei steigender Diurese eigenartige Zunahmen der Harnstoffclearance und versuchte, diese Erscheinung durch abrupte Schwankungen der Wasserrückresorption zu erklären. Der tote Raum kommt als

maßgebliche Fehlerquelle auch in unseren Versuchen nicht in Frage. Bei 2 von 18 Katzen traten auch ohne forcierte Diurese und ohne wesentliche Steigerung des Sulfatspiegels ungewöhnlich hohe Clearancewerte auf. In 2 Perioden wurde sogar die Kreatininclearance übertroffen. Diese, in den Abbildungen nicht berücksichtigten Ausnahmen, dürften auf pathologischen Veränderungen der Nieren beruhen.

2. Die Ausscheidung von Phenolschwefelsäure. Die Nierenausscheidung von Phenolschwefelsäure wurde an 6 Katzen und 2 Hunden bei Plasmakonzentrationen zwischen 5 und 45 mg-% geprüft. Die

Tabelle 1

Zeit/min	Kreat. Clear. ml/min	Plasma-S mg-%	Sulfat Clear. ml/min	Clear. Sulfat / Clear. Kreat.	Sulfatrückresorption in mg/100 ml Glomerulumfiltrat
Katze ♀; 2,5 kg					
ab 0 Infusion einer Lösung von 2220 mg-% Natriumsulfat; 1,5 ml/min					
25— 35	8,7	18,5	3,6	0,36	12,3
35— 45	9,3	20,75	3,92	0,42	12,0
45— 55	9,3	23,0	3,95	0,43	13,2
ab 55 Infusion einer Lösung von 3330 mg-% Natriumsulfat; 1,5 ml/min					
75— 85	9,7	31,8	3,88	0,40	19,0
85— 95	9,3	33,45	4,14	0,45	18,6
95—105	9,25	35,1	3,82	0,42	20,6
ab 105 Infusion einer Lösung von 4440 mg-% Natriumsulfat; 1,5 ml/min					
125—135	8,5	49,0	3,58	0,42	28,3
135—145	8,6	52,65	3,27	0,38	32,8
145—155	8,65	56,3	3,56	0,41	33,1
ab 155 Infusion einer Lösung von 5550 mg-% Natriumsulfat; 1,5 ml/min					
175—185	8,35	66,0	3,44	0,41	38,9
185—195	8,4	69,25	3,35	0,40	41,5
195—205	8,75	72,5	3,57	0,41	42,8

Clearance von organischem Sulfat war dabei in keiner von insgesamt 60 Perioden größer als die von Kreatinin. Im Gegensatz zu den Befunden von SPERBER an Hühnern und Ziegen wurde Phenolschwefelsäure demnach bei unseren Katzen und Hunden nicht tubulär ausgeschieden.

Die Mehrzahl der Versuche verlief ähnlich dem in Tab. 2. Der Quotient Clearance organisches Sulfat/Kreatininclearance betrug bei Plasmakonzentrationen von 5—8 mg-% im allgemeinen 0,1—0,2 und stieg bei 15—20 mg-% auf Werte um 0,5, bei 30—40 mg-% auf rund 0,7 an. Es wurden jedoch erhebliche Abweichungen von diesen Durchschnittsergebnissen beobachtet. So wurde die Kreatininclearance bei einem Hund nach Erhöhung des organischen Sulfatspiegels auf 35 mg-% von der Sulfatclearance erreicht. Bei einer Katze stieg der Quotient Clearance organisches Sulfat/Kreatininclearance auch nach Erhöhung des Sulfatspiegels auf 52 mg-% nicht über 0,1 an. Diese Ausnahmen gehen

auf Abweichungen der Sulfatrückresorption zurück: Bei dem betreffenden Hund wurden besonders niedrige, bei der einen Katze extrem hohe Rückresorptionswerte errechnet. Im allgemeinen lag die Rückresorption jedoch in dem aus Tab. 2 ersichtlichen Bereich. Sie blieb in 4 Versuchen bei Plasmasulfatkonzentrationen über 20—30 mg-% konstant, nahm in anderen aber auch weiterhin noch etwas zu.

Das anorganische Sulfat im Blutplasma stieg während der Infusion von Phenolschwefelsäure nicht wesentlich an. Eigenartigerweise war die Rückresorption von anorganischem Sulfat in den Phenolschwefelsäureversuchen aber trotz gleicher Diurese im Verhältnis zur Sulfatfiltration etwas größer als in den Versuchen ohne Zufuhr von organischem Sulfat (Tab. 2).

Tabelle 2

Zeit/min	Kreat. Clear. ml/min	Organ. Plasma-S. mg-%	Organ. Sulfat Clear. ml/min	Clear. org. Sulfat / Clear. Kreat.	Org. Sulfat-rückresorption in mg/100 ml Glomerulum-filtrat	Clear. anorg. S. / Clear. Kreat.
Katze ♀; 2,9 kg						
ab 0 Infusion von physiologischer Kochsalzlösung						
ab 40 Infusion einer Lösung von 2300 mg-% Phenolschwefelsäure; 1,5 ml/min						
60— 70	9,3	12,16	5,24	0,56	5,38	0,10
70— 80	8,1	16,16	4,54	0,56	7,15	0,09
80— 80	10,8	20,16	5,71	0,53	9,54	0,10
ab 90 Infusion einer Lösung von 3800 mg-% Phenolschwefelsäure; 1,5 ml/min						
110—120	10,5	28,32	7,26	0,69	8,85	0,09
120—130	10,4	30,32	6,51	0,63	11,10	0,08
130—140	10,3	32,32	6,62	0,64	11,50	0,10
ab 140 Infusion einer Lösung von 5360 mg-% Phenolschwefelsäure; 1,5 ml/min						
160—170	10,7	42,40	8,07	0,75	10,50	0,09
170—180	10,6	41,92	8,08	0,76	9,80	0,06
180—190	11,8	41,44	9,48	0,80	8,13	0,07

Diskussion

Die Rückresorption von anorganischem Sulfat steigt bei der Katze fortlaufend mit der Sulfatfiltration an und erreicht bei höheren Plasmakonzentrationen schließlich Werte über 40 mg S pro 100 ml Glomerulumfiltrat. Dies hat zur Folge, daß die Sulfatausscheidung mit zunehmender Sulfatbelastung bei der Katze langsamer ansteigt als beim Hund, dessen Sulfatrückresorption durch ein tubuläres Maximum beschränkt ist. Bessere Übereinstimmung findet sich allerdings im Bereich physiologisch niedriger Plasmakonzentrationen, wo die Sulfatrückresorption beider Species die Sulfatausscheidung bei weitem übertrifft.

Die oben angeführten Speciesunterschiede könnten für den Sulfathaushalt von Bedeutung sein: Das tubuläre Maximum liegt beim Hund dicht oberhalb der physiologischen Sulfatspiegel (Lotspeich), so daß

geringe Zunahmen der Sulfatbelastung schon zur quantitativen Ausscheidung der überschießend filtrierten Sulfatmenge führen; bei der Katze konserviert die Niere dagegen auch bei erhöhter Sulfatbelastung noch beträchtliche Anteile des abfiltrierten Sulfats.

Bislang sind allerdings keine Umstände bekannt, die dieses verschiedene Verhalten der Sulfatrückresorption erforderlich erscheinen lassen. Hier wäre vielleicht an Besonderheiten des Eiweißstoffwechsels zu denken, der — zusammen mit der Nierenausscheidung — maßgeblich an der Einstellung des Sulfatspiegels beteiligt ist. Es sei daran erinnert, daß anorganisches Sulfat zur Bildung von Schwefelsäureestern, vor allem zur Phenolentgiftung, herangezogen wird (Dziewiatkowski) und nicht als überflüssiges, reaktionsträges Stoffwechselendprodukt zu bewerten ist.

Die Besonderheiten der Sulfatausscheidung finden sich allerdings auch bei anderen Harnbestandteilen der Katze wieder. Eggleton u. Habib sowie Taugner, v. Bubnoff u. Braun fanden z. B. auch für Orthophosphat, Eggleton u. Shuster für Glucose kein tubuläres Rückresorptionsmaximum. Ähnliches scheint bei der Katze schließlich für die Rückresorption von Ascorbinsäure, Glykokoll und Alanin zu gelten (Taugner u. Gillissen). Alle diese Stoffe gehören aber beim Hund, und, soweit geprüft, auch beim Menschen zu den typischen „Tm-Substanzen", d. h. sie werden von Transportmechanismen mit beschränkter Kapazität rückresorbiert. In der Katzenniere sind offenbar zahlreiche Rückresorptionsmechanismen zur Aufrechterhaltung höherer Rückresorptionswerte eingerichtet. Sie scheinen daher über besonders große Energiereserven zu verfügen.

Eggleton u. Habib hatten zur Erklärung der hohen Orthophosphatrückresorption auch passive Rücksdiffusionsvorgänge diskutiert. Besonders hohe Durchlässigkeit der Tubuluszellen in der Katzenniere würde vielleicht auch die ausgiebige Rückresorption der anderen Stoffe verständlich machen. In diesem Zusammenhang erscheint bemerkenswert, daß die Harnkonzentration von Sulfat in unseren Versuchen niemals unter der Plasmakonzentration lag. Den gleichen Befund an Kaninchen hat Schou tatsächlich als Hinweis auf Rückdiffusionsvorgänge betrachtet (siehe auch Hayman u. Johnston sowie White u. Monaghan, vgl. jedoch H. W. Smith). Diese Deutung dürfte für die Sulfatausscheidung der Katze aber nicht zutreffen: Die Sulfatclearance war hier nicht unabhängig vom Sulfatspiegel und wurde durch die Diurese — vor allem im Vergleich zu Harnstoff, dem Prototyp rückdiffundierender Substanzen — nur wenig beeinflußt.

Welche von verschiedenen möglichen Faktoren in erster Linie für die Diureseabhängigkeit aktiver Rückresorptionsprozesse verantwortlich sind, wäre für den Einzelfall erst zu entscheiden. Lotspeich beobachtete bei Kochsalzbelastung an Hunden eine Verminderung der Sulfatrückresorption und meinte, daß die Sulfatrückresorption bei osmotischer Diurese ähnlich der Wasserrückresorption durch den steilen osmotischen Gradienten behindert werden könne. Auf derartige Überlegungen soll später an Hand besser geeigneter Beispiele wie Ascorbinsäure oder Glykokoll zurückgekommen werden. Die Sulfatausscheidung wurde nur bei starker osmotischer Diurese und auch durch diese erst nach Steigerung der Plasmasulfatwerte über 15 mg-% deutlich vermehrt. Dies mag damit zusammenhängen, daß die Sulfatrückresorption der Katze an sich schon auf die Überwindung größerer

osmotischer Hindernisse eingerichtet ist und so erst bei maximaler osmotischer Belastung und gleichzeitiger Steigerung des Sulfatspiegels beeinträchtigt wird. Lotspeich u. Berglund haben später allerdings beim Hund Verminderungen der Sulfatrückresorption beschrieben, die nicht durch die osmotische Wirkung von Kochsalz, sondern durch den Vorgang der Chloridrückresorption bedingt sein sollen (vgl. auch Schwartz, Smith u. Winkler).

Die Wasserdiurese scheint bei Katzen und Hunden ohne Einfluß auf die Sulfatrückresorption zu sein[1]. Dies könnte auf der im Vergleich zur osmotischen Diurese geringeren Verminderung des U/P-Wertes für Kreatinin oder auf den andersartigen osmotischen Veränderungen im Tubuluslumen beruhen, aber auch dadurch bedingt sein, daß die Sulfatrückresorption proximal vom Ort der fakultativen Wasserrückresorption erfolgt. Aus unseren Versuchen mit Aminosäuren geht noch deutlicher hervor, daß sich osmotische Diurese und Wasserdiurese bei gleicher Verminderung des U/P-Wertes verschieden auswirken können (vgl. Shannon). Dieser Umstand ist in älteren Versuchen über den Einfluß der Diurese auf die Sulfatausscheidung meist nicht berücksichtigt worden. Da außerdem oft nicht auf konstante Sulfatspiegel geachtet wurde, sind die verschiedentlich beobachteten Veränderungen der Sulfatclearance nicht mit Sicherheit auf gleichzeitige Variationen der Diurese zu beziehen.

Die Beobachtungen von Sperber, wonach Phenolschwefelsäure bei Hühnern und Ziegen tubulär ausgeschieden wird, konnte an Katzen und Hunden nicht bestätigt werden. Die Kopplung an Schwefelsäure führt bei Katzen und Hunden daher im wesentlichen nur zur Verminderung der Phenoltoxicität (Baumann), während die Nierenausscheidung sich weiterhin im Rahmen der Filtration bewegt.

Zusammenfassung

Die Rückresorption von anorganischem Sulfat ist bei der Katze, im Gegensatz zu den Verhältnissen beim Hund, nicht durch ein tubuläres Maximum beschränkt.

Die Nierenausscheidung von Phenolschwefelsäure ist bei Katzen und Hunden durch Filtration und Rückresorption charakterisiert; eine tubuläre Ausscheidung von organischem Sulfat wurde bei Infusion von Phenolschwefelsäure nicht beobachtet.

Literatur

Baumann, E.: Hoppe-Seylers Z. physiol. Chem. **2**, 335 (1878).
Braun, W., V. P. Whittaker and W. D. Lotspeich: Amer. J. Physiol. **190**, 563 (1957).
Cope, C. L.: J. Physiol. (Lond.) **76**, 329 (1932).
Dziewiatkowski, D. D.: J. biol. Chem. **178**, 389 (1949).
Eggleton, M. G., and Y. A. Habib: J. Physiol. (Lond.) **111**, 423 (1950).
Eggleton, M. G., and S. Shuster: J. Physiol. (Lond.) **124**, 613 (1954).
Goudsmit, A., M. H. Power and J. L. Bollmann: Amer. J. Physiol. **125**, 506 (1939).
Hayman, J. M., and S. M. Johnston: J. clin. Invest. **11**, 607 (1932).

[1] Aus den Versuchen von Cope sowie Goudsmit u. Mitarb., auch aus den Daten von Hayman u. Johnston (Tab. 4) läßt sich unseres Erachtens keine sichere Beeinflussung der Sulfatrückresorption durch die Wasserdiurese ableiten.

Lieb, H., u. M. K. Zacherl: Hoppe-Seylers Z. physiol. Chem. **223**, 169 (1934).
Lotspeich, W. D.: Amer. J. Physiol. **151**, 311 (1947).
Lotspeich, W. D., and F. Berglund: Amer. J. Physiol. **185**, 533 (1956).
Power, M. H., and E. G. Wakefield: J. biol. Chem. **123**, 665 (1938).
Schmid, E., H. Ganz, W. Braun u. R. Taugner: Naunyn-Schmiedebergs Arch. exp. Path. Pharmakol. **224**, 452 (1955).
Schou, P.: Acta physiol. scand. **7**, 183 (1944).
Schwartz, B. M., P. K. Smith and A. W. Winkler: Amer. J. Physiol. **137**, 658 (1942).
Shannon, J. A.: Amer. J. Physiol. **122**, 782 (1938).
Smith, H. W.: The Kidney, New York 1951.
Sperber, I.: Scand. J. clin. Lab. Invest. **1**, 345 (1949).
Taugner, R., M. v. Bubnoff u. W. Braun: Pflüg. Arch. ges. Physiol. **258**, 133 (1953).
Taugner, R., u. J. Gillissen: Naunyn-Schmiedebergs Arch. exp. Path. Pharmak. im Druck.
Terp, P.: Acta pharmacol. (Kbh.) **7**, 259 (1951).
White, H. L., and B. Monaghan: Amer. J. Physiol. **104**, 412 (1933).

Dr. J. Gillissen, Pharmakologisches Institut der Universität Heidelberg, Hauptstraße 47/51

Arch. exper. Path. u. Pharmakol., Bd. 233, S. 550—555 (1958)

Aus dem Pharmakologischen Institut der Universität in Debrecen/Ungarn
(Vorstand: Prof. Dr. T. Vályi-Nagy)

Neue Untersuchungen zur Pharmakologie des Narceins

Von
B. Kelentey, E. Stenszky und F. Czollner

Mit 3 Textabbildungen

(Eingegangen am 19. Dezember 1957)

Narcein wurde zuerst von Pelletier im Jahre 1832 aus Opium als Nebenalkaloid in einer Menge von 0,1—0,2% isoliert. Chemisch ist es ein Isochinolinderivat. Nach Untersuchungen von Magendie u. Orfila erwies sich Narcein als unwirksam. Dagegen fanden Albers u. Claude Bernard für Narcein eine ähnliche schmerzstillende Eigenschaft wie für Morphin und Codein. Reisner u. Oetinger beobachteten nur eine minimale narkotische und schmerzstillende Wirkung. Versuche von Kersch zeigten an Hunden und Kaninchen keine narkotische Wirkung.

Diese Widersprüche könnten durch die Verunreinigung mit den neben dem Narcein vorkommenden Nebenalkaloiden verursacht sein. Deswegen wurde es notwendig, unsere Kenntnisse über dieses Alkaloid zu überprüfen. Wir untersuchten die Toxicität des Narceins, seine Wirkung auf das Atemzentrum, seine schmerzstillende — und hustenhemmende, ferner seine Wirkung auf Blutdruck, Uterus und Darm.

Methodik

Zu unseren Untersuchungen verwendeten wir das Natriumsalz des mehrmals umkristallisierten und in Wasser gut löslichen Narceins mit einem Schmelzpunkt von 163—165° C, das uns die Alkaloid-Fabrik Tiszavasvár darstellte.

Die Toxicität (LD 50) wurde an Gruppen von je 10 Mäusen und je 5 Kaninchen mittels der Kärber-Behrensschen Methode ermittelt.

Nach i.v. Verabreichung der Derivate wurde die Atmungsfrequenz und das Atemvolumen registriert. Ungefähr nach 10—15 min — so lange dauerte die Verteilung — wurde die kleinste Dosis des Narceins bestimmt, die die Leistung um 30—35% veränderte. Diese Untersuchungen wurden an je 5 Kaninchen durchgeführt.

Die schmerzstillende Wirkung wurde mittels der Porszász-Herrschen Methode geprüft. Das Versuchstier wurde auf eine auf 56° C gewärmte Metallplatte fallengelassen, wobei es als Zeichen des Schmerzreflexes mit Pfotenlecken reagiert. Neben dieser Methode wurde auch die Hardy-Goodel-Wolffsche Dolorimeter-Methode angewandt, deren Vorzug darin besteht, daß die erhaltenen Werte in g cal/cm²-Wert angegeben werden können.

Zur Prüfung der hustenhemmenden Wirkung ließen wir die Versuchstiere die Eichler-Smiateksche 1%ige Schwefeldioxyd-Luftmischung einatmen und registrierten pro Minute die Veränderung der in 15 sec ausgelösten Hustenstöße. Versuchstiere waren teils Meerschweinchen, teils Mäuse.

Zur Prüfung der Blutdruck-, Darm- und Uteruswirkung wurden mit Chloralose narkotisierte Katzen benutzt, Registrierung des Blutdruckes auf blutigem Wege mit einem Hg-Manometer in der Carotis. Die Darmperistaltik wurde mittels eines in den unteren Abschnitt des Ileums eingebundenen Ballons mit Mareyscher Kapselübertragung registriert. Vor der Verabreichung des Narceins wurde die Empfindlichkeit jedes Versuchstieres auf i.v. Zufuhr von Adrenalin, Acetylcholin und Histamin getestet.

Ergebnisse

Toxicitätsuntersuchungen an Mäusen hatten folgende Ergebnisse:

Tabelle 1

Dosis g/kg	0,5	1,0	1,5	2,0	2,5
Zahl der Versuchstiere	10	10	10	10	10
Zahl der verstorbenen Tiere	—	—	2	4	8

LD 50 = 2,0 g/kg

Narcein war bei i.v. Verabreichung an je 5 Kaninchen mit 1,8 bis 2,2 g/kg bei Hunden mit 2,2 g/kg, und bei Katzen mit 0,8 g/kg tödlich.

Die Vergiftungssymptome sind sehr spärlich. Es entstehen weder ausgesprochene Krampfbereitschaft noch ein tetanieformer Zustand, auch keine klonischen Zuckungen, wie sie nach einer tödlichen Codein- oder Morphindosis zu beobachten sind. Die Tiere liegen mit erschlafften Muskeln in somnolentem Zustand. Dieser hypnotische Zustand, der nie so tief ist wie bei Morphin — das Tier kann leicht aufgeweckt werden —, führt schließlich zur Atemlähmung. Vor dem Tod erfolgen keine Krämpfe. Auch die Straubsche Schwanzreaktion fehlt; die Pupillen sind eng, aber reagieren auf Licht gut. Der Schwellenwert für Schmerzreize nimmt auch bei subtoxischen Dosen nicht zu. Ebenso ist das Auftreten des Pfotenleckreflexes nicht verzögert.

Die Prüfung der auf das Atmungszentrum ausgeübten Wirkung führten wir an je 5 Kaninchen durch. In kleinen Dosen (10, 50, 100 mg/kg) steigert Narcein bei i.v. Verabreichung die Atemfrequenz und vergrößert das Atemvolumen um 18, 24, 58% der Ausgangswerte. Diese Wirkung dauert 1 Std lang. Verglichen mit anderen auf das Atmungszentrum erregend wirkenden Arzneimitteln sind 50—75 mg/kg Narcein mit der Wirkung von 1 mg/kg Lobelin bzw. mit 5 Vol.-% Co_2 gleichwertig. Die Ergebnisse sind in der Tab. 2 zusammengefaßt.

50 mg/kg Narcein i.v. steigerte also die Atemfrequenz der Kaninchen um 29% im Mittel.

Ähnliche Ergebnisse hatten die in Abb. 1 dargestellten Versuche. Wir untersuchten die Atemfrequenzveränderung an je 5 Kaninchen nach i.v. Verabreichung von 10, 50 und 100 mg/kg Narcein und 0,5, 1,0, 2,0 mg/kg Morphin. Abhängig von der Dosis steigerte Narcein die Atemfrequenz, während Morphin sie proportional mit der Dosis verminderte. Diese

depressive Wirkung zeigte nach Zufuhr von 1 mg/kg Morphin einen Wert von 49,8—66% und hielt 3—4 Std an.

Geht die Narceinbehandlung der i.v. Verabreichung des Morphins voran, so bleibt die depressive Wirkung des Morphins aus oder ist vermindert. In den Versuchen der Abb. 2 war die normale Atemfrequenz des

Tabelle 2

Nr.	Normale Atemfrequenz in 1 min	Nach Narcein 50 mg/kg	Atemfrequenzzunahme in/Prozent
1.	98	120	22
2.	122	136	11
3.	108	130	17
4.	104	122	15
5.	68	98	44
6.	64	102	59
7.	96	118	23
8.	88	125	42
Mittelwerte	93,5	119	29% ($\sigma = 17{,}1$)

Versuchstieres 120 min. Nach Zufuhr von 1 mg/kg Morphin verminderte sie sich auf die Hälfte. Gleichzeitig nahm das Atemvolumen erheblich ab. Dieser Zustand kann durch Zufuhr von 200 mg/kg Narcein aufgehoben

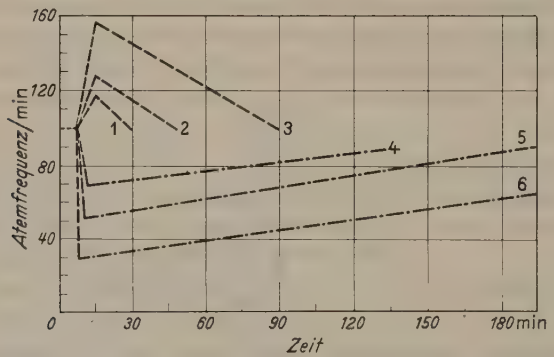


Abb. 1. Kaninchen. Beeinflussung der Atemfrequenz durch Narcein und Morphin. *1*, 10 mg/kg Narcein; *2* 50 mg/kg Narcein; *3* 100 mg/kg Narcein; *4* 0,5 mg/kg Morphin; *5* 1 mg/kg Morphin; *6* 2 mg/kg Morphin

werden. Im unteren Teil der Abbildung stellen wir die Wirkung einer gleichzeitigen Verabreichung von 100 mg/kg Narcein und 1 mg/kg Morphin dar. Wir sehen, daß weder die Atemfrequenz noch das Volumen eine wesentliche Neigung zur Depression zeigt.

Die Wirkung von 50 mg/kg Narcein ist mit derjenigen von 1 mg/kg Lobelin oder 5 Vol-% CO_2 vergleichbar.

Zur Prüfung der hustenhemmenden Wirkung legten wir die Reduktion der Zahl der mit der erwähnten Schwefeldioxyd-Methode ausgelösten Hustenstöße bei Mäusen im Vergleich zu Codein zugrunde (Tab. 3).

Aus der Tabelle ist ersichtlich, daß 50 mg/kg Narcein an Mäusen die Zahl der Hustenstöße ungefähr im gleichen Maße vermindert wie 10 mg/kg Codein.

a

b

Abb. 2. a Kaninchen, 2,4 kg. Atemfrequenz nach 1 mg/kg Morphin und 200 mg/kg Narcein i.v. b Dasselbe Kaninchen nach 3 Tagen untersucht: Atemfrequenz nach 100 mg/kg Narcein + 1 mg/kg Morphin i.v.

Narcein verursacht in kleinen Dosen (1, 5, 10 mg/kg) keine wesentliche Blutdruckveränderung, größere Dosen (50—100 mg/kg) haben eine kurzdauernde Blutdrucksenkung zur Folge.

Tabelle 3

Nr.	Gewicht in g	Zahl der Hustenstöße (Kontrollen)	Nach 10 mg/kg Codein s.c.	Nach 50 mg/kg Narcein s.c.
1.	30	68	28	12
2.	20	80	26	27
3,	20	80	28	28
4.	30	75	25	22
5.	25	76	25	26
6.	20	72	30	22
Mittelwerte		75 ($\sigma = 4{,}67$)	26 ($\sigma = 2$)	28 ($\sigma = 5{,}86$)

Die Uteruskontraktionen der trächtigen Katze werden seltener und kräftiger; auf den nichtträchtigen Uterus übt Narcein (50 mg/kg) keine Wirkung aus. Die Darmperistaltik wird gesteigert (Abb. 3).

Das durch Zufuhr von 1—2 mg/kg Morphin ausgelöste Starkensteinsche Halluzinationsstadium und die Straubsche Schwanzreaktion kann durch Verabreichung von 150—200 mg/kg Narcein vermindert oder vorübergehend auch verhütet werden. Die Wirkung des Morphins ist viel stärker als die des antagonistischen Narceins; deshalb treten die oben genannten Reaktionen nach 2—3 Std wieder auf.

Narcein ist aber auch in großen Dosen (300—400 mg/kg) nicht imstande, an Mäusen die tödliche Wirkung des Morphins (300 mg/kg) zu verhindern.

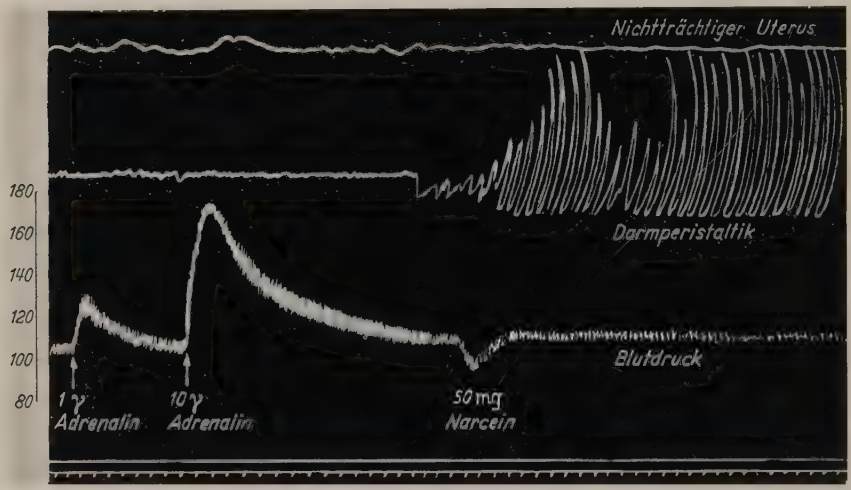


Abb. 3. Katzenversuch. Gewicht: 2,300 g Chloralose-narkose/0,11 g/kg. Registriert wurden die Kontraktionen des Uterus, Darmperistaltik und Blutdruck

Tabelle 4

Nr.	Temperatur normal	Nach 10 mg/kg Narcein	Unterschied in °C
1.	38,4	36,3	—2,1
2.	39,2	38,2	—1,0
3.	38,4	37,3	—1,1
4.	37,8	34,3	—3,5
5.	37,4	35,2	—2,2
6.	37,9	34,0	—3,5
7.	37,8	36,7	—1,1
8.	38,2	36,6	—1,6
9.	38,0	34,0	—4,0
10.	37,1	36,2	—0,2
11.	38,1	37,0	—1,1
12.	37,4	36,1	—1,3
Mittelwerte	38,7	35,9	—1,9

Die antagonistische Wirkung des Narceins ist spezifisch, da es gegenüber Versuchstieren in Barbituratnarkose unwirksam und nicht imstande ist, die Lähmung des Atmungszentrums bei solchen Tieren aufzuheben.

Beim Prüfen der Wirkung des Narceins auf die Körpertemperatur an Mäusen und Kaninchen ergab sich, daß diese signifikant absinkt (vgl. Tab. 4).

Zusammenfassung

An Mäusen, Kaninchen, Hunden und Katzen wurde die Toxicität des Narceins geprüft. Bei allen vier Tierarten ergaben sich hohe LD_{50}-Dosen, durchschnittlich zwischen 1,8—2,2 g/kg. Narcein wirkt nach i.v. Verabreichung von 50 mg/kg auf das Atmungszentrum des Kaninchens erregend und steigert die Atemfrequenz und das Atemvolumen abhängig von der Dosis um 30—35%. Es besitzt keine schmerzstillende Wirkung. Seine hustenhemmende Wirkung ist der des Codeins ähnlich. Von seinen anderen pharmakologischen Wirkungen sind eine geringe blutdrucksenkende, starke darmperistaltiksteigernde Eigenschaft hervorzuheben. Außerdem werden auf seine Einwirkung die Kontraktionen des trächtigen Uterus seltener aber kräftiger. Narcein ist imstande, die Wirkung des Morphins auf die Atmung mit 150—200 mg/kg-Dosen aufzuheben. Diese Wirkung ist spezifisch, da es gegenüber Barbituraten keine antagonistische Eigenschaft besitzt.

Literatur

Albers, J. F. H.: Virchows Arch. path. Anat. **26**, 225 (1863).
Bernard, Cl.: C. R. Acad. Sci. **59**, 406 (1864).
Eichler, O., u. A. Smiatek: Naunyn-Schmiedeberg's Arch. exp. Path. Pharmak. **194**, 621 (1945).
Kärber N., et B. Behrens: cit. Chabrier, M. P.: Ann. pharm. franç. **261**, 8 (1950).
Kersch, H.: Memorabilien, Heilbronn **159**, 2 (1868).
Magendie, L., u. O. Orfila: Lehrbuch der Toxikologie **2**, 208 (1854).
Oetinger, H.: Dissertation. Tübingen 1866.
Pelletier, R.: Journ. de pharm. 1832.
Porszász, J., u. F. Herr: Kisérl. Orvostud. **2**, 93 (1950).
Reissner, F.: Allg. Z. Psychiat. **24**, 74 (1867).
Wolff, H. G., J. D. Hardy and H. Goodel: J. clin. Invest. **29**, 68 (1944).

Dr. Barna Kelentey, Orvostudományi Egyetem, Gyógyszestani Intezét
Debrecen 12/Ungarn

Arch. exper. Path. u. Pharmakol., Bd. 233, S. 556—558 (1958)

Aus dem Pharmakologischen Institut der Universität Göttingen
(Direktor: Professor Dr. med. L. LENDLE)

Ein einfaches Gerät zur Umwandlung kleinster mechanischer Impulse in elektrische Steuerimpulse

Von
H. DAL RI und H. SLAMA

Mit 2 Textabbildungen

(Eingegangen am 13. Februar 1958)

Bei pharmakologischen Untersuchungsmethoden wird oft die Frequenzänderung eines rhythmischen Vorganges zur Beurteilung der biologischen Wirksamkeit von Stoffen mit herangezogen. Zur Registrierung wird hierbei meist der Ordinatenschreiber oder auch ein direkt-

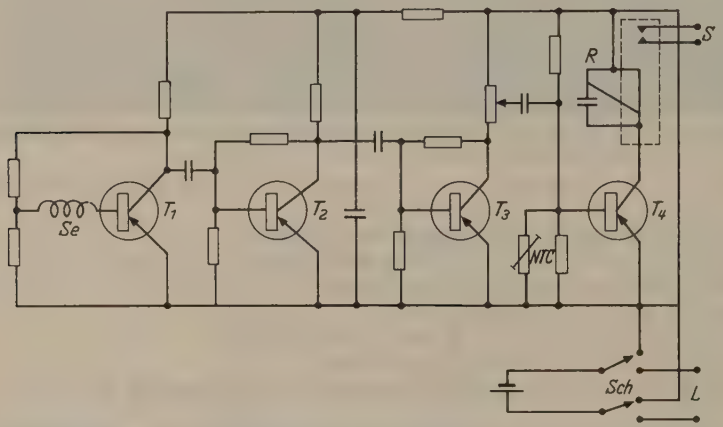


Abb. 1. Prinzipschaltbild des Impulswandlers. *Sch* Schalter: Ein — Aus; *L* Ladebuchsen für Batterie in Stellung: Aus; *Se* Selenoid; T_1—T_4 Transistoren; *R* Schaltrelais; *NTC* Temperaturabhängiger Widerstand; *S* Schaltkontakt für Ordinatenschreiber

anzeigendes Impulszählgerät verwendet. Die Schwierigkeit bei diesen Aufzeichnungen liegt allgemein darin, geeignete Geberelemente zu finden, die in der Lage sind, die nötigen Steuerimpulse zu liefern.

Die Anforderungen, die an solche Elemente zu stellen sind, können von den meisten Industriefertigungen nicht erfüllt werden, zum anderen sind diese Fabrikate mit hohen Anschaffungskosten verbunden. Es wurde daher ein Geber entwickelt, der bei geringem Aufwand in seinen Verwendungsmöglichkeiten vielseitig ist.

Als Ausführungsbeispiel wurde ein Impulswandler für Pulsfrequenzregistrierung gewählt. Folgende Anforderungen mußten hierbei erfüllt werden:

1. Unabhängigkeit von der absoluten Blutdruckhöhe und ihren Schwankungen,
2. möglichst geringe Maße der beweglichen Einheit,
3. hohe Ansprechempfindlichkeit,
4. Abnahme der Pulse von einer Druckkapsel, über die gleichzeitig der absolute Blutdruck mit seinen Schwankungen registriert wird,
5. Ordinatenschreiber[1] als Registriergerät mittels Rußkymo.

Die Abb. 1 gibt das Prinzipschaltbild des Gerätes wieder. Die Bewegung der Membran der Druckkapsel wird auf einen Permanentmagneten übertragen. Dieser taucht in ein Selenoid ein und induziert bei Bewegung einen Strom. Der Induktionsstrom wird einem RC-gekoppelten Transistorenverstärker zugeführt, dessen Ausgangsspannung ein Relais steuert. Die Schaltkontakte des Relais lösen den eigentlichen Steuervorgang aus.

Die Schaltung des Transistorenverstärkers ist so ausgelegt, daß wahlweise nur negative oder nur positive Bewegungen, d. h. Bewegungen des Permanentmagneten in die Spule hinein oder aus der Spule heraus, das Schaltrelais ausprechen lassen.

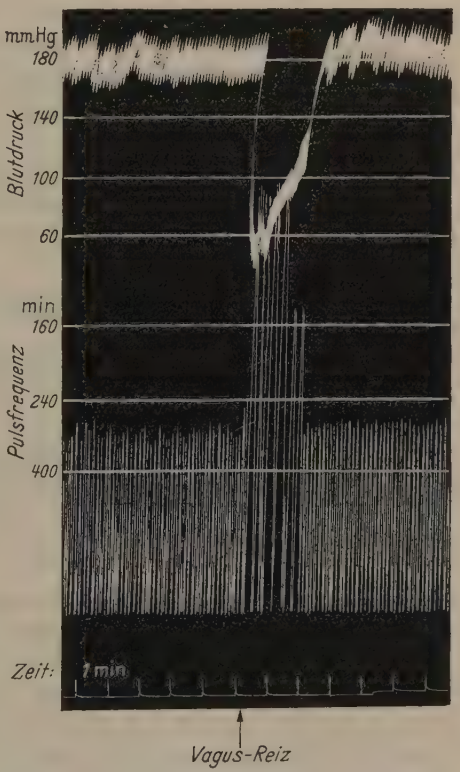


Abb. 2. Beispiel für die Arbeitsweise des Meßgerätes: Pulsfrequenzmessung bei Katzen. (Aus registriertechnischen Gründen wurde eine Untersetzerstufe 25:1 zwischengeschaltet). Katze ♀ 3,1 kg. Chloralose-Urethan-Vagotomie

Bei dem vorliegenden Ausführungsmuster wurden als Permanentmagnet Stifte von 3 mm Durchmesser und 5 mm Länge aus Ferroxdure 100 (VALVO GMBH, Hamburg) verwendet. Die Spule hatte einen Ohmschen Widerstand von 350 Ohm und wurde aus 0,05 mm CuI Draht

[1] Wir verdanken der Deutschen Forschungsgemeinschaft die Leihgabe des verwendeten Gerätes.

auf einen Kern von 6 mm lichter Weite und 20 mm Länge gewickelt. Der Verstärker wurde mit Transistoren des Typs OC 71 und OC 72 (VALVO GMBH, Hamburg) aufgebaut und war in einem Bereich von 10° C bis 36° C temperaturkompensiert. Die Stromversorgung erfolgte aus Kleinst-Akkumulatoren (DEAC-Zellen). Als Schaltrelais wurde ein Kleinpol-Telegraphen-Relais mit einem Schaltstrom von 2,0 mA (Siemens & Halske) verwendet.

Die größte Empfindlichkeit, bei der noch einwandfreie Steuerimpulse abgegeben werden, betrug weniger als 0,1 mm Bewegungsamplitude und konnte stufenweise bis auf 1 : 10 abgeschwächt werden.

Um die Arbeitsweise des Meßgerätes zu veranschaulichen ist in Abb. 2 eine Kurve dargestellt. Es handelt sich um eine narkotisierte Katze, bei der die Pulsfrequenz mittels Ordinatenschreiber aufgezeichnet wurde. Die mechanischen Impulse wurden von einer Blutdruckkapsel abgenommen und auf den Permanentmagneten übertragen. Aus der Abbildung geht hervor, daß die absolute Blutdruckschwankung bei Vagusreizung von mehr als 100 mm Hg die Arbeitsweise des Gerätes nicht beeinflußt.

Zusammenfassung

Es wird ein Gerät beschrieben, mit dem bei geringem Aufwand kleinste mechanische Impulse in elektrische Steuerimpulse umgewandelt werden.

Dr. H. DAL RI, Göttingen, Pharmakologisches Institut d. Universität, Geiststr. 9
Feinmechanikermeister H. SLAMA, Göttingen, Fliederweg 21

Arch. exper. Path. u. Pharmakol., Bd. 233, S. 559—566 (1958)

Aus der Pharmakologischen Abteilung
der LEO Pharmaceutical Products, Kopenhagen

Beeinflussung der Cardiazolkrampfschwelle durch veränderten 5-Hydroxytryptamingehalt des Zentralnervensystems

Von
WALTER KOBINGER

Mit 1 Textabbildung

(Eingegangen am 21. Februar 1958)

Für Reserpin wurde wiederholt ein fördernder Einfluß auf tonische Streckkrämpfe, ausgelöst durch elektrische Reizung oder Krampfgifte, beschrieben (JENNY 1954; CHEN, ENSOR u. BOHNER 1954); diese Wirkung dürfte hauptsächlich auf eine Erleichterung der Krampfausbreitung innerhalb des Zentralnervensystems zurückzuführen sein (CHEN u. ENSOR 1954).

Reserpin führt zu einer Freisetzung der biogenen Amine 5-Hydroxytryptamin (Serotonin) (PLETSCHER, SHORE u. BRODIE 1956) und Noradrenalin (HOLZBAUER u. VOGT 1956; PAASONEN u. VOGT 1956; BRODIE und Mitarb. 1957) aus dem Gehirn. Durch Vorbehandlung mit Isopropyl-isonicotinsäurehydrazid (Iproniazid), einem Hemmkörper von Aminoxydasen in Zellhomogenaten (ZELLER u. Mitarb. 1952), wird die sedative und narkoseverlängernde Wirkung des Reserpins aufgehoben bzw. in eine erregende Wirkung umgewandelt, während gleichzeitig die Verarmung des Gehirns an 5-Hydroxytryptamin verhindert wird (BRODIE, PLETSCHER u. SHORE 1956; CHESSIN, KRAMER u. SCOTT 1957; HOLTZ u. Mitarb. 1957).

Die Untersuchung, wie Iproniazid die erwähnte fördernde Wirkung von Reserpin auf tonische Streckkrämpfe beeinflußt, schien daher von Interesse. Anschließend an diese Fragestellung und im Hinblick auf die kürzlich beschriebene Erhöhung des 5-Hydroxytryptamingehalts im Gehirn durch antiepileptisch wirksame Substanzen (BONNYCASTLE, PAASONEN u. GIARMAN 1957), war es naheliegend, die Krampfbereitschaft bei erhöhtem 5-Hydroxytryptamingehalt des Gehirns zu untersuchen.

Iproniazid führt in vivo zu einer Zunahme des 5-Hydroxytryptamingehaltes im Gehirn; die höchsten Konzentrationen treten dabei etwa 16—24 Std nach der Injektion auf (PLETSCHER 1956). Ebenso kann durch 5-Hydroxytryptophan, das im Organismus zu 5-Hydroxytryptamin decarboxyliert wird, eine beträchtliche Vermehrung des Amines im Gehirn erzielt werden (UDENFRIEND, WEISSBACH u. BOGDANSKY 1957).

HOLTZ u. Mitarb. (1957) konnten vor kurzem zeigen, daß, nach Iproniazidvorbehandlung, die Aminosäure Dioxyphenylalanin ebenso

wie 5-Hydroxytryptophan eine zentralerregende, narkoseverkürzende Wirkung hervorruft. Dioxyphenylalanin wird im Organismus rasch zu Oxytyramin decarboxyliert (Holtz u. Mitarb. 1939, 1942; Blaschko 1942) und ist wahrscheinlich eine Vorstufe bei der biologischen Noradrenalin- und Adrenalinsynthese (Holtz u. Kroneberg 1949; Euler u. Udden 1951; Brücke u. Mitarb. 1956). Um festzustellen, ob Veränderungen der Krampfschwelle auch Brenzcatechinderivaten zukommen, wurde Dioxyphenylalanin in die nachfolgenden Untersuchungen einbezogen.

Methodik

Alle Versuche wurden an Mäusen mit der von Orloff, Williams u. Pfeiffer (1949) beschriebenen Methode durchgeführt. In Abständen von 10 sec wurde 0,05 ml einer 0,5%igen Cardiazollösung (Pentamethylentetrazol) in die Schwanzvene infundiert. Das erste Auftreten sowohl von klonischen als auch von tonischen Krämpfen wurde registriert und das Volumen der bis zum Erreichen dieser zwei Endpunkte injizierten Cardialzollösung zur Berechnung herangezogen. Es wurden Albinomäuse beiderlei Geschlechtes im Gewicht von 20—21 g aus einem laboratoriumseigenen Stamm verwendet, die unter gleichen Bedingungen aufgezogen worden waren. Alle Versuche wurden im Verlauf von zwei Monaten durchgeführt; an jedem Versuchtstag wurden etwa 30 Tiere in 5—6 gleich große Gruppen aufgeteilt, wobei eine Gruppe als Kontrolle, die restlichen als Versuchsgruppen dienten.

Iproniazid (Isopropyl-isonicotinsäurehydrazid[1]) wurde 18—20 Std, d, l-5-Hydroxytryptophan[1], l-Dioxyphenylalanin (DOPA[2]) und Reserpin (in wäßriger Lösung mit Ascorbinsäure 1 : 20) jeweils 3 Std vor Versuchsbeginn intraperitoneal injiziert.

Ergebnisse

Zunächst wurden die Mittelwerte aus den Cardiazoldosen, die bis zum Auftreten klonischer und tonischer Krämpfe injiziert worden waren, errechnet. Aus Tab. 1 ist ersichtlich, daß Unterschiede zwischen den einzelnen Versuchsgruppen am deutlichsten beim Vergleich der Werte für tonische Krämpfe hervortreten. Diese tonischen Krämpfe waren in der Mehrzahl aller Versuche maximale Streckkrämpfe, die sofort nach kurzdauernden Beugekrämpfen einsetzten.

Die durch Reserpin, 5 mg/kg, deutlich erniedrigte Schwelle für tonische Krämpfe konnte durch Vorbehandlung mit 100 mg/kg Iproniazid über den Kontrollwert erhöht werden, während Iproniazid allein keine Veränderung der Krampfbereitschaft zur Folge hatte. 5-Hydroxytryptophan, 50 mg/kg, führte zu einer sehr geringen Erhöhung der Krampfschwelle, wurde jedoch Iproniazid vor 5-Hydroxytryptophan injiziert, dann war die Empfindlichkeit der Tiere gegen tonische Cardiazolkrämpfe deutlich vermindert. Die gleiche Veränderung, in geringerem Ausmaß, konnte aber auch nach DOPA, 50 mg/kg, beobachtet

[1] Für die Herstellung und Überlassung bin ich Herrn W. O. Godtfredsen zu Dank verpflichtet.

[2] Fluka A. G., Buchs.

werden, wenn die Tiere mit Iproniazid vorbehandelt worden waren. DOPA allein führte zu keiner Veränderung der tonischen Krampfschwelle.

Bei graphischer Darstellung der Cardiazoldosen, die bis zum Auftreten tonischer Krämpfe infundiert worden waren, nach der Häufigkeit ihres Vorkommens, zeigte sich, daß bei den Kontrolltieren und bei

Tabelle 1. *Intravenöse Infusion von Cardiazol* (0,5%, 0,05 ml/10 s). Mäuse 20—21 g. Iproniazid wurde 18—20 Std, Reserpin, 5-Hydroxytryptophan und DOPA jeweils 3 Std vorher i. p. injiziert

Vorbehandlung	n	spontane Aktivität vor Cardiazol Inf.	Milliliter Cardiazol m ± s		Prozent d. Tiere mit max. Streckkrämpfen	Prozent überlebender Tiere
			Beginn der klonischen Krämpfe	tonische Krämpfe		
Kontrollen	116	normal	0,17 ± 0,03 (1,00)	0,35 (1,00)	98	1,7
Reserpin 5 mg/kg	20	vermind.	0,16 ± 0,02 (0,94)*	0,19 (0,54)*	100	0
Iproniazid 100 mg/kg + Reserpin 5 mg/kg	50	erhöht	0,19 ± 0,06 (1,11)	0,46 (1,31)	98	1,9
Iproniazid 100 mg/kg	55	normal	0,17 ± 0,04 (1,00)	0,37 (1,05)	100	5,6
5-Hydroxytryptophan 50 mg/kg	50	normal	0,19 ± 0,04 (1,11)	0,42 (1,20)	100	2,0
Iproniazid 100 mg/kg + 5-Hydroxytryptophan 50 mg/kg	50	erhöht	0,20 ± 0,04 (1,17)	0,55 (1,57)	92	8,0
DOPA 50 mg/kg	43	normal	0,19 ± 0,05 (1,11)	0,35 (1,00)	93	7,0
Iproniazid 100 mg/kg + DOPA 50 mg/kg	47	erhöht	0,22 ± 0,02 (1,29)	0,48 (1,37)	91	8,6

* Verhältnis: $\frac{\text{Schwelle nach Vorbehandlung}}{\text{Schwelle der Kontrollen}}$

einigen Versuchsgruppen keine einheitliche Normalverteilung vorlag (Abb. 1); eine Berechnung signifikanter Unterschiede der in Tab. 1 angeführten Mittelwerte mußte daher verworfen werden.

Die Häufigkeitskurven der Kontrollgruppe sowie der Gruppen nach Iproniazid und nach 5-Hydroxytryptophan lassen zwei deutlich voneinander getrennte Normalkurven erkennen. Ein unterschiedliches Verhalten von männlichen und weiblichen Mäusen konnte mittels χ^2-Test an 57 Kontrolltieren (36 m., 21 w.) ausgeschlossen werden. Dabei wurde die Anzahl der über und unter 0,35 ml Cardiazol mit Streckkrampf reagierenden männlichen und weiblichen Tiere verglichen ($\chi^2 = 0{,}02$;

$P > 0{,}5$); die Wahl der Grenzdosis war durch die deutliche Trennung der Kurven in Abb. 1a gegeben.

Aus Abb. 1c geht hervor, daß die für Reserpin charakteristische Herabsetzung der Krampfschwelle durch Iproniazid-Vorbehandlung jedenfalls verhindert wurde und daß ein größerer Teil der Tiere bei Cardiazolvolumina über 0,35 ml mit Streckkrampf reagierte als bei der Kontrollgruppe. Durch Abb. 1f läßt sich der erhöhte

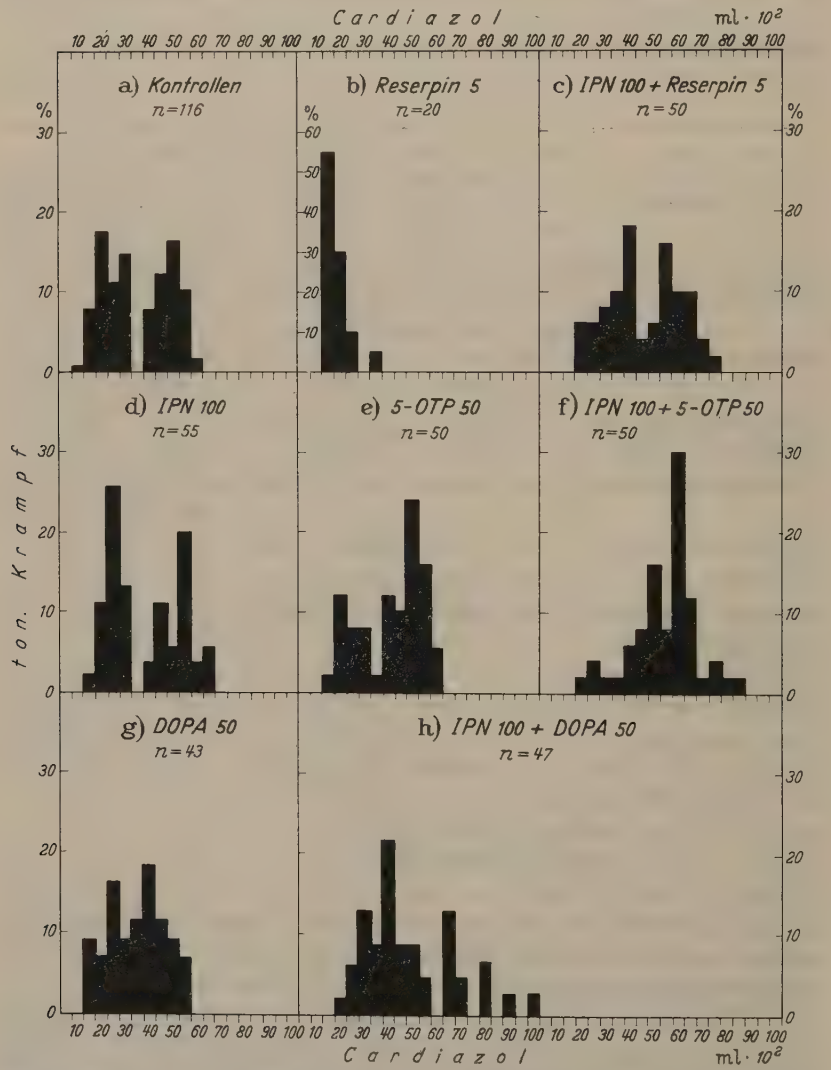


Abb. 1. *Häufigkeit des Auftretens von tonischen Streckkrämpfen bei verschiedenen Cardiazoldosen.* Abszisse: Volumen der 0,5%igen Cardiazollösung. Ordinate: Häufigkeit in Prozent. (In 1b veränderter Ordinatenmaßstab). *IPN* Iproniazid; *5-OTP* 5-Hydroxytryptophan; *DOPA* Dioxyphenylalanin; Dosen in mg/kg. Zeitpunkt der Injektionen wie in Tab. 1.

Mittelwert nach Iproniazid + 5-Hydroxytryptophan in Tab. 1 durch weitgehende Verminderung des Anteiles an Tieren mit niedriger Krampfschwelle erklären, außerdem liegt das Maximum der Häufigkeitskurve um 0,10 ml Cardiazol höher als das zweite Maximum der Kontrollkurve. Ein statistischer Vergleich der beiden zuletzt genannten Kurven mittels t-Test war wegen der unterschiedlichen Streuung ($F = 13{,}6$; $P < 0{,}05$) nicht möglich. Auch in Abb. 1h (Iproniazid + DOPA) fällt der gegenüber der Kontrollgruppe verringerte Anteil an Tieren mit niederer Krampfschwelle auf; etwa ein Viertel der Tiere reagierten erst bei Cardiazolvolumina über 0,60 ml. Die Häufigkeitskurven nach Iproniazid (1d) und 5-Hydroxytryptophan (1e) zeigen denselben Verlauf und ähnliche Verteilung wie die der Kontrollgruppe. Mittels χ^2-Test wurde auch hier die Anzahl der unter und über 0,35 ml Cardiazol reagierenden Tiere mit denen der Kontrollgruppe verglichen. Für Iproniazid ergab diese Berechnung keine signifikante Abweichung von der Kontrollgruppe ($\chi^2 = 0{,}004$; $P > 0{,}5$), während für 5-Hydroxytryptophan eine signifikante Zunahme der über 0,35 ml Cardiazol mit Streckkrampf reagierenden Tieranzahl berechnet werden konnte ($\chi^2 = 4{,}7$; $0{,}05 > P > 0{,}01$).

Diskussion

Aus den vorliegenden Resultaten ergibt sich die Frage, welcher Zusammenhang zwischen den experimentell gesetzten Veränderungen des 5-Hydroxytryptaminspiegels im Gehirn und den beobachteten Veränderungen der Cardiazolkrampfschwelle besteht.

Die Herabsetzung der tonischen Krampfschwelle durch Reserpin wurde durch Iproniazid ebenso verhindert, wie die sedative Wirkung und die 5-Hydroxytryptaminausschüttung (Brodie, Pletscher u. Shore 1956). Es ist daher nicht auszuschließen, daß die Krampfschwellenerniedrigung nach Reserpin an die 5-Hydroxytryptaminverarmung des Gehirns gebunden ist. Eine Vermehrung des 5-Hydroxytryptamins im Gehirn durch Iproniazid (Pletscher 1956; Udenfriend u. Mitarb. 1957) führte jedoch zu keiner Veränderung der Krampfbereitschaft.

Die Entscheidung, welche Signifikanz der nach 5-Hydroxytryptophan beobachteten Erhöhungen der Krampfschwelle zukommt, wird durch die zweigipflige Häufigkeitsverteilung der Cardiazoldosen, die an Kontrolltieren bis zum Auftreten tonischer Krämpfe injiziert wurden, erschwert (Abb. 1). Da alle Versuchstiere aus derselben Zucht stammten, unter gleichen Bedingungen aufgezogen worden waren, die Kontrollgruppe über ein Viertel des untersuchten Tiermaterials umfaßte und zeitlich über die ganze Versuchsperiode aufgeteilt wurde, muß mit dem Vorkommen von zwei Tiergruppen mit deutlich unterschiedlicher Krampfschwelle im gesamten, untersuchten Kollektiv gerechnet werden. Eine zweigipflige Häufigkeitskurve für das Auftreten von Krämpfen nach intravenöser Cardiazolinjektion konnte Biehler (1940) an Kaninchen verschiedener Rassen beobachten, während Nachtsheim (1939) besonders empfindliche „Epilepsiestämme" auch innerhalb einer Kaninchenrasse beschrieb.

Die beobachtete und statistisch gesicherte Verminderung der gegen Cardiazol besonders empfindlichen Tiergruppe durch 5-Hydroxytryptophan (Abb. 1e) ist möglicherweise nur bei einem Tiermaterial mit ähnlicher Häufigkeitsverteilung der Krampfschwelle wie im vorliegenden Fall nachweisbar. Dafür würde auch der orientierende Versuch von Bonnycastle, Giarman u. Paasonen (1957) sprechen,

der keine Schutzwirkung von 5-Hydroxytryptophan oder Iproniazid gegen Cardiazolkrämpfe an Ratten ergab.

5-Hydroxytryptophan nach Iproniazidvorbehandlung zeigte eine deutliche Erhöhung der Krampfschwelle, die, wie die Herabsetzung nach Reserpin, hauptsächlich das tonische Krampfstadium betrifft. Ein ähnliches Verhalten, geringe Beeinflussung der klonischen Krampfphase und Aufhebung des tonischen Extensorkrampfes, wurde von Chen, Bohner u. Ensor (1954) an der gleichen Methode für Diphenylhydantoin beschrieben.

Eine spezifisch antikonvulsive Wirkung des im Gehirn angereicherten 5-Hydroxytryptamins als Ursache der beobachteten Krampfschwellenerhöhung erscheint aber auf Grund folgender Überlegungen unwahrscheinlich: Udenfriend u. Mitarb. (1957) fanden im Gehirn von Ratten nach Iproniazid 75 mg/kg bzw. 5-Hydroxytryptophan 75 mg/kg einen auf das Doppelte, bei Kombination beider Stoffe einen auf das Sechsfache des Normalwertes erhöhten 5-Hydroxytryptamingehalt, während Bonnycastle, Giarman u. Paasonen (1957) nach wirksamen Dosen antiepileptischer Pharmaka eine Steigerung auf das 1,5—2fache feststellten.

Wäre die 5-Hydroxytryptaminkonzentration im Gehirn von entscheidender Bedeutung für eine antikonvulsive Wirkung, dann müßten Iproniazid bzw. 5-Hydroxytryptophan eine ebenso deutliche, beide Substanzen kombiniert eine intensivere, antikonvulsive Wirkung als antiepileptische Pharmaka aufweisen, was in den vorliegenden Versuchen nicht der Fall war. Es ist allerdings nicht ausgeschlossen, daß Substanzen mit spezifisch antikonvulsiver Wirkung in örtlich begrenzten Gehirnanteilen zu höheren 5-Hydroxytryptaminkonzentrationen führen als Iproniazid und 5-Hydroxytryptophan.

Die Tatsache, daß nach Vorbehandlung mit Iproniazid, DOPA ebenso wie 5-Hydroxytryptophan die Cardiazolkrampfschwelle erhöht, spricht für eine unspezifische Wirkung der aus den beiden Aminosäuren entstehenden Amine auf das Zentralnervensystem. In beiden Fällen war die Erhöhung der Krampfschwelle mit einer Aktivitätssteigerung der Tiere verbunden (Tab. 1).

Die erregende und analeptische Wirkung von 5-Hydroxytryptophan und DOPA nach Iproniazid erklären Holtz u. Mitarb. (1957) durch Anhäufung der entsprechenden freien Amine im Stammhirn, das die höchste Decarboxylase- und Aminoxydaseaktivität aufweist, und einer daraus erfolgenden Stimulierung des ascendierenden reticulären Systems. Es ist bekannt, daß gesteigerte Körpertemperatur die Elektroschockschwelle an Ratten erhöht (Toman u. Goodman 1947); erregende Stoffe wie Amphetamin oder Cocain können in hohen Dosen tonische Cardiazolstreckkrämpfe vollständig verhindern (Chen u. Bohner 1956). Es ist

daher anzunehmen, daß auch große Mengen freier Aminosäuren, die sich bei Iproniazidvorbehandlung nach 5-Hydroxytryptophan und DOPA im Zentralnervensystem anhäufen, über ihre erregende Wirkung zu einer Krampfschwellenerhöhung führen.

Damit würde aber auch die über den Kontrollwert erhöhte, tonische Krampfschwelle nach Reserpin bei Iproniazidvorbehandlung (Tab. 1) eine Erklärung finden, da Reserpin 5-Hydroxytryptamin aus dem Gehirn freisetzt, das jedoch bei blockierter Aminoxydase nicht abgebaut werden kann und zu ähnlichen Erregungszuständen führt, wie 5-Hydroxytryptophan und DOPA nach Iproniazid.

Summary

1. The seizure threshold of mice was determined by means of timed i.v. infusion of Pentamethylenetetrazol (Metrazol, Cardiazol), after changing the Serotonin content of the brain by pretreatment with Reserpine, which is known to liberate Serotonin, an inhibitor of amine-oxydase activity Iproniazid (IPN), and the precursor of Serotonin 5-Hydroxytryptophan (5-HTP).

2. The facilitation of the tonic extensor seizure response by 5 mg/kg Reserpine was prevented by the previous injection of 100 mg/kg IPN; moreover, after this pretreatment a higher average dose of Metrazol was required to produce extensor seizures, as in controls.

3. IPN 100 mg/kg produced no change of the seizure threshold. A small elevation of the threshold for tonic convulsions was observed after treatment with 50 mg/kg 5-HTP. When the animals were pretreated with IPN, the injection of 5-HTP exerted a distinct elevation of the threshold for tonic convulsions. The same threshold elevation followed the injection of 50 mg/kg Dihydroxyphenylalanin (DOPA) after pretreatment with IPN, while DOPA alone was ineffective.

4. When amine-oxydase activity is inhibited by IPN, an increase of spontaneous activity is exerted by 5-HTP, DOPA and Reserpine. This action, produced by excess of liberated amines, is considered to be related with the observed elevation of threshold for tonic seizures.

Literatur

Biehler, W.: Allg. Z. Psychiat. **116**, 316 (1940).

Blaschko, H.: J. Physiol. (Lond.) **101**, 337 (1942).

Bonnycastle, D. D., N. J. Giarman and M. K. Paasonen: Brit. J. Pharmacol. **12**, 228 (1957).

Bonnycastle, D. D., M. K. Paasonen and N. J. Giarman: Fed. Proc. **16**, 284 (1957).

Brodie, B. B., J. S. Olin, R. G. Kuntzman and P. A. Shore: Science **1957**, 1293.

Brodie, B. B., A. Pletscher and P. A. Shore: J. Pharmacol. exp. Ther. **116**, 9 (1956).

Brücke, F., W. Kobinger, O. Kraupp u. B. Pillat: Biochem. Z. **328**, 56 (1956).

Chen, G., and B. Bohner: Fed. Proc. **15**, 408 (1956).
Chen, G., and B. Bohner: J. Pharmacol. exp. Ther. **119**, 559 (1957).
Chen, G., B. Bohner and C. R. Ensor: Proc. Soc. exp. Biol. (N. Y.) **87**, 334 (1954).
Chen, G., and C. R. Ensor: Proc. Soc. exp. Biol. (N. Y.) **87**, 602 (1954).
Chen, G., C. R. Ensor and B. Bohner: Proc. Soc. exp. Biol. (N. Y.) **86**, 507 (1954).
Chessin, M., E. R. Kramer and C. Scott: J. Pharmacol. exp. Ther. **119**, 453 (1957).
Euler, U. S., v., and P. Udden: Experientia (Basel) **7**, 465 (1951).
Holtz, P., H. Balzer, E. Westermann u. E. Wezler: Naunyn-Schmiedeberg's Arch. exp. Path. Pharmak. **231**, 333 (1957).
Holtz, P., K. Credner u. W. Koepp: Naunyn-Schmiedeberg's Arch. exp. Path. Pharmak. **200**, 356 (1942).
Holtz, P., R. Heise u. K. Lüdtke: Naunyn-Schmiedeberg's Arch. exp. Path. Pharmak. **191**, 87 (1939).
Holtz, P., u. G. Kroneberg: Naunyn-Schmiedeberg's Arch. exp. Path. Pharmak. **206**, 150 (1949).
Holzbauer, M. F., and M. Vogt: J. Neurochem. **1**, 8 (1956).
Jenney, E. H.: Fed. Proc. **13**, 370 (1954).
Nachtsheim, H.: Dtsch. med. Wschr. **1939**, 168.
Orloff, M. J., H. L. Williams and C. C. Pfeiffer: Proc. Soc. exp. Biol. (N. Y.) **70**, 254 (1949).
Paasonen, M. K., and M. Vogt: J. Physiol. (Lond.) **131**, 617 (1956).
Pletscher, A.: Helv. physiol. pharmacol. Acta **14**, C76 (1956).
Pletscher, A., P. A. Shore and B. B. Brodie: J. Pharmacol. exp. Ther. **116**, 46, 84 (1956).
Toman, J. E. P., and L. S. Goodman: Res. Publ. Ass. nerv. ment. Dis. **26**, 141 (1947)
Udenfriend, S., H. Weissbach and D. F. Bogdanski: J. biol. Chem. **224**, 803 (1957).
Zeller, E. A., J. Barsky, J. R. Fouts, W. F. Kirchheimer and L. S. Van Orden: Experientia (Basel) **8**, 349 (1952).

Dr. med. Walter Kobinger,
Pharmakol. Abteilung der LEO Pharmaceutical Products, Kopenhagen/Dänemark

Arch. exper. Path. u. Pharmakol., Bd. 233, S. 567—568 (1958)

Aus dem Pharmakologischen Institut und dem I. Physikalischen Institut der Universität Heidelberg

Kurze Mitteilung

Verbesserungen am bubble-flow-meter mit automatischer Registrierung

Von

H. Friedburg, E. U. Schäfer und R. Taugner

Mit 1 Textabbildung

(Eingegangen am 11. Februar 1958)

An gleicher Stelle ist früher[1] ein einfaches bubble-flow-meter mit automatischer Registrierung beschrieben worden (Braun, Althoff u. Taugner). Beim Nachbau dieses Gerätes hat sich gezeigt, daß die Funktion der Schaltung kritisch von den

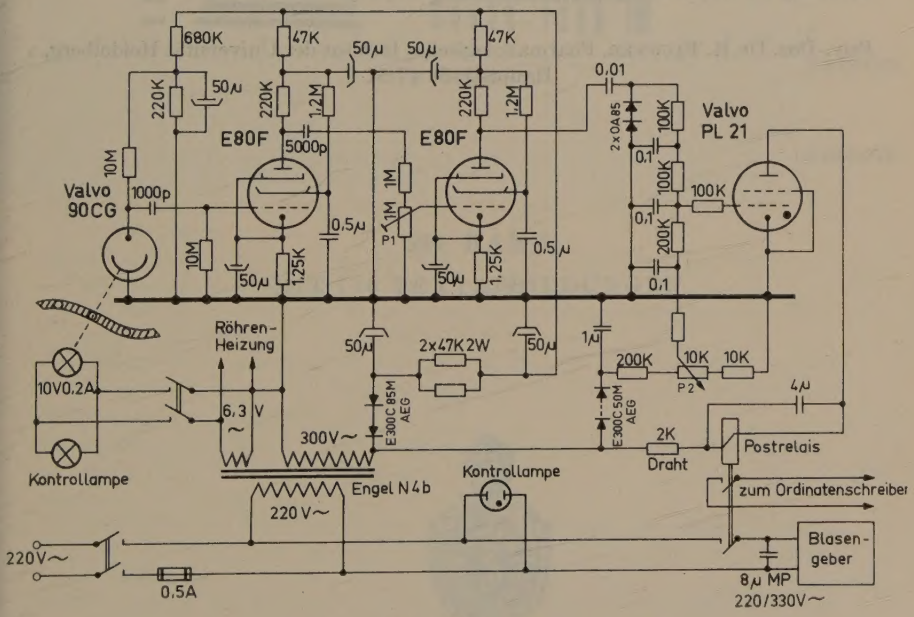


Abb. 1 Schaltskizze

Eigenschaften des verwendeten Netztransformators abhängt. Außerdem war die Notwendigkeit einer gesonderten Gleichstrombatterie zum Betrieb des Elektromagneten im Blasengeber lästig.

Das dem Gerät von verschiedenen Seiten entgegengebrachte Interesse veranlaßte uns zum Bau eines bubble-flow-meters von größerer Betriebssicherheit und

[1] Naunyn-Schmiedeberg's Arch. exp. Path. Pharmak. **222**, 529 (1954).

mit reiner Wechselstromspeisung. Das Meßprinzip des alten Gerätes (Blaseneingabe in Abhängigkeit von der Laufzeit) wurde beibehalten.

Der Aufbau des Blasengebers (Injektionsspritze und zwei Fahrradventile mit Kondomgummibespannung, die eine gewisse Wartung erfordern) blieb unverändert, nur wurde der Gleichstrommagnet des alten Gerätes durch einen Wechselstrommagneten ersetzt. Da der Selbstbau eines betriebssicheren Wechselstrommagneten schwierig ist, wurde ein umgebautes Starkstrom-Schaltschütz verwendet. Die neue Schaltung ist nebenstehend wiedergegeben. Beim Durchgang einer Blase fällt das Licht eines Lämpchens auf eine Photozelle. Die Stromimpulse der Photozelle werden von einem zweistufigen Wechselspannungsverstärker verstärkt und dann gleichgerichtet. Mit der gleichgerichteten Signalspannung wird über ein Thyratron und ein Postrelais der Blasengeber gesteuert. Ein zweiter Kontakt des Postrelais betätigt beim Blasendurchgang den Ordinatenschreiber.

In dieser Schaltung wird nur die Wechsellicht-Komponente des Lämpchens wirksam. Es hat sich gezeigt, daß diese Komponente bei einem mit 6,3 Volt Wechselspannung betriebenen 10 V/0,2 A-Lämpchen stärker ist als bei einer Glimmlampe.

Die Verstärkung kann durch das Potentiometer P 1 in weiten Grenzen verändert werden, wodurch eine Anpassung an die verschiedensten Verwendungszwecke möglich wird. Die Feineinstellung der Empfindlichkeit erfolgt durch Veränderung der Thyratron-Vorspannung mit dem Potentiometer P 2.

Priv.-Doz. Dr. R. Taugner, Pharmakologisches Institut der Universität Heidelberg, Hauptstraße 47/51